



Tesina para obtención del título de la Licenciatura en Bioquímica

Detección de sulfuro de hidrógeno por formación de excímeros de pireno

Manuela Pose

Orientador: Dr. Ernesto Cuevasanta

Co-Orientador: Dr. Matías N. Möller

Laboratorio de Enzimología y Físicoquímica Biológica, Facultad de Ciencias,
UdelaR.

Octubre 2020, Montevideo, Uruguay.

Indice

1.Resumen	5
2.Introducción	6
Sulfuro de hidrógeno	6
Propiedades fisicoquímicas	6
Reactividad	6
Relevancia bioquímica	7
Rutas de formación endógena de sulfuro	9
Cistationina β -sintasa (EC 4.2.1.22)	10
Cistationina γ -liala (EC 4.4.1.1)	11
3-Mercaptopiruvato azufretransferasa (EC 2.8.1.2)	13
Formación intestinal de sulfuro	14
Rutas de consumo de sulfuro	15
Ruta mitocondrial de oxidación de sulfuro	15
Sulfuro quinona oxidoreductasa (EC 1.8.5.8)	15
Persulfuro dioxigenasa (EC 1.13.11.18)	17
Rodanasa (EC 2.8.1.1)	17
Sulfito oxidasa (EC 1.8.3.1)	17
Oxidación de sulfuro por hemoproteínas	18
Concentraciones de sulfuro en tejidos mamíferos	19
Métodos de cuantificación de sulfuro	20
Métodos basados en su capacidad reductora	20
Métodos basados en su capacidad de unirse a cationes metálicos	21
Métodos basados en su nucleofilicidad	22
Azul de metileno	23
Nueva estrategia para la detección de sulfuro	24
3.Objetivos	26
Objetivo general	26
Objetivos específicos	26
4.Materiales y métodos	27

Preparación de soluciones	27
Obtención y tratamiento de glóbulos rojos	27
Estudio de la formación de excímeros por dos posibles sondas	27
Caracterización de los productos de reacción con MEPB	28
Caracterización espectroscópica	28
Espectros UV	28
Espectros de emisión corregidos	28
Espectros de excitación	28
Separación de productos por HPLC	28
Optimización de las condiciones de trabajo	28
Impacto del solvente en la detección de sulfuro	28
Efecto de la polaridad del solvente en la formación de excímeros	28
Etanol como solvente alternativo	29
Estabilidad de MEPB frente a hidrólisis alcalina	29
Optimización del tiempo de reacción	29
Cinética exploratoria	29
Cinética de pseudo-primer orden para MEPB	29
Estrategia de atrapado del sulfuro como ZnS aplicado a la reacción con MEPB	29
Estudio de la linealidad y el límite de detección	30
Estudio de la linealidad en el rango micromolar y submicromolar	30
Estudio de la linealidad en la separación por HPLC	30
Búsqueda del rango de linealidad	30
Estudio de la linealidad en el rango nanomolar	30
Linealidad de la respuesta en el método Zn^{2+} -DTPA	30
Curva de calibración a partir de la fase gaseosa	31
Respuesta del método frente a posibles interferentes	33
Interferencia por nucleófilos de interés bioquímico	33
Interferencia por tioles	33
Cinética de consumo de sulfuro por glóbulos rojos	34
Medidas con alícuotas tomadas de la fase acuosa	34
Prueba de reductores	34
Medidas con alícuotas tomadas de la fase gaseosa	35
Control cinético de equilibrio de fases	35
5.Resultados	36
Estudio de la formación de excímeros por dos posibles sondas.	36
Caracterización de los productos de reacción con MEPB	41
Caracterización espectroscópica	41

Espectros de absorción	41
Espectros de emisión corregidos	42
Espectros de excitación	42
Separación de los productos por HPLC	43
Optimización de las condiciones de trabajo	44
Estudio del solvente	44
Efecto de la polaridad del solvente	44
Etanol como solvente alternativo	45
Uso de etanol en la dilución posterior a la reacción	45
Estabilidad de MEPB frente a la hidrólisis alcalina	46
Optimización del tiempo de reacción	47
Cinética exploratoria	47
Cinética de pseudo-primer orden para MEPB	51
Estudio de la reacción de ZnS con MEPB	54
Atrapado de H ₂ S en partículas de ZnS	54
Cinética del método Zn ²⁺ -DTPA	55
Linealidad y límite de detección	56
Estudio de la linealidad en el rango micromolar	56
Estudio de la linealidad en la separación por HPLC	57
Búsqueda del rango de linealidad	57
Estudio de la linealidad en el rango nanomolar	58
Linealidad de la respuesta en el método Zn ²⁺ -DTPA	60
Curva de calibración a partir de la fase gaseosa	61
Análisis de posibles interferentes	62
Interferencia por tioles	64
Curva de calibración con exceso de GSH	64
Aplicación biológica	66
Cinética de consumo de sulfuro por glóbulos rojos	66
Medidas con alícuotas tomadas de la fase acuosa	66
Medidas con alícuotas tomadas de la fase gaseosa	69
Cinética de equilibramiento de fases	69
6.Conclusiones	72
7.Bibliografía	73

1. Resumen

La reputación del sulfuro de hidrógeno (H_2S) ha sufrido un cambio radical en las últimas décadas. Hasta fines del siglo XX, el sulfuro de hidrógeno era considerado principalmente un gas tóxico, subproducto industrial o producto de desecho del metabolismo de bacterias. El descubrimiento de su formación en los tejidos de los mamíferos, así como la observación de distintos efectos fisiológicos, en particular vasodilatación y neuromodulación, luego de su administración en bajas dosis, provocó que se lo comience a considerar como un señalizador celular. Desde entonces, se han desarrollado métodos para la detección de sulfuro de hidrógeno en este nuevo contexto, ya que sigue siendo una limitante al momento de estudiarlo en sistemas bioquímicos. Escasean los métodos rápidos, robustos y selectivos. Una complicación recurrente se da por la presencia de altas concentraciones de tioles en los sistemas de interés bioquímico. En este trabajo se caracterizó una nueva forma de detección de sulfuro de hidrógeno a través de la formación de excímeros de pireno. La reacción secuencial del sulfuro de hidrógeno con dos moléculas de una sonda de pireno derivatizada con N-etilmaleimida, 2-maleimidoetil-4-pirenilbutanoato (MEPB), genera una señal fluorescente característica distinguible, por ejemplo, del producto generado por los tioles. Se optimizaron las condiciones de reacción y la formación de excímeros se confirmó en base a métodos espectroscópicos y separativos. Se estudió el efecto del solvente y el pH óptimo para la reacción. De manera de poder establecer un tiempo de incubación prudente, se caracterizó la cinética de reacción y, con el apoyo de modelados matemáticos, se determinaron las constantes cinéticas para los dos pasos de reacción ($(34 \pm 1) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para la reacción de sulfuro con MEPB y $(6.2 \pm 0.9) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para la reacción del intermediario con una segunda molécula de MEPB). Por otro lado, se evaluó la linealidad de la respuesta fluorescente con la concentración de sulfuro y se determinó el límite de detección del método ($0,1 \mu\text{M}$), comprobando su utilidad en rangos de concentración sub-micromolares. Se evaluó la interferencia de distintas moléculas de interés bioquímico (cisteína, glutatión, tiosulfato) en la señal de fluorescencia, concluyendo que su interferencia es relativamente leve incluso a altas concentraciones. Se implementó la detección de sulfuro en precipitados de sulfuro de zinc (comúnmente utilizadas para el atrapado de sulfuro en solución) mediante el tratamiento de las muestras con el quelante DTPA. Finalmente, se aplicó el método en medidas de consumo de sulfuro de hidrógeno por glóbulos rojos. Si bien la sonda tiene sus limitaciones, como la posibilidad de hidrólisis o su solubilidad limitada, en este trabajo se comprobó la posibilidad de utilización de excímeros de pireno para la detección de sulfuro de hidrógeno y se abre un camino novedoso para el desarrollo de diseños optimizados.

2.Introducción

Sulfuro de hidrógeno

Propiedades fisicoquímicas

Sulfuro de dihidrógeno es como la IUPAC sugiere referirse al H_2S , que es el compuesto hidrogenado del azufre en el menor estado de oxidación estable. Es una molécula análoga al agua, pero como el azufre presenta una electronegatividad menor a la del oxígeno, el momento dipolar del H_2S es menor (0,97 D, comparado con 1,85 D para el agua). Esta diferencia repercute negativamente en la capacidad de formar enlaces de hidrógeno, lo cual hace que a temperatura ambiente y presión atmosférica el H_2S sea un gas, con punto de ebullición de $-60\text{ }^\circ\text{C}^1$.

Es soluble en agua (110 mM a $25\text{ }^\circ\text{C}$ y 1 atm) y en solución acuosa tiene un comportamiento ácido (Ecs. 1 y 2), motivo por el cual se lo suele denominar ácido sulfhídrico, con un pK_{a1} de 7,0 y un $pK_{a2} > 17$ a $25\text{ }^\circ\text{C}$ para las disociaciones (Ecs. 1 y 2)².



Estos valores determinan que, en condiciones fisiológicas, a pH 7,4, predomine la especie monoaniónica (HS^- , anión hidrosulfuro) en un 71,5 %, mientras el 28,5 % restante está en la forma protonada (H_2S , sulfuro de hidrógeno). La especie dianiónica (S^{2-} , sulfuro), se desprecia por encontrarse en concentraciones insignificantes a pHs fisiológicos. A lo largo de este texto, con el objetivo de simplificar, se utilizará el término “sulfuro” para referirse a ambas especies en solución acuosa, cuya distribución estará determinada por el pH de trabajo.

Reactividad

El sulfuro, específicamente el HS^- , es un nucleófilo, cuya reacción genérica con un electrófilo (E_1^+) puede plantearse según la Ec. 3. El producto tiene un protón que puede disociarse para reaccionar con un segundo electrófilo (E_2^+) según Ec. 4. Es por esto que se considera al sulfuro como un doble nucleófilo.



El sulfuro también puede oxidarse. El potencial de reducción por dos electrones del HSSH para formar sulfuro $E^{o'}$ (HS_2^- , $H^+/2 HS^-$) es de $-0,23\text{ V}^3$, indicando que el sulfuro es un buen reductor. El potencial de reducción por un electrón $E^{o'}$ (S^- , H^+/HS^-) fue determinado experimentalmente y tiene un valor de $+0,9\text{ V}^4$. Si bien este valor implica que la reacción por un electrón sea difícil de lograr, se ha visto que el sulfuro puede ser oxidado por metales de transición, esto puede ser explicado por la alta reactividad de los productos HS^-/S^- cuyo consumo desplaza el equilibrio hacia la oxidación⁵. La autooxidación de sulfuro implica complicaciones técnicas en su

manipulación, ya que, en solución, puede darse su oxidación por oxígeno atmosférico, metales de transición o complejos metálicos presentes en forma de trazas. Si bien la oxidación de sulfuro por oxígeno molecular no es favorable termodinámicamente (Ec. 5), con un $\Delta E^\circ = -1.26$ V, ocurre lentamente en solución⁶ y puede ser catalizada por trazas de metales⁷. Esto implica que en soluciones de sulfuro expuestas al aire se generan otros compuestos oxidados de azufre que pueden disminuir su concentración original y actuar como impurezas.



En el contexto biológico, se plantea que la modificación de tioles para formar persulfuros (RSSH) es uno de los mecanismos por el cual el sulfuro ejerce distintas funciones señalizadoras, ya que se ha visto que la modificación proteica por persulfuración de residuos de cisteína es capaz de modular la actividad de diferentes proteínas blanco. La formación de persulfuros también ha sido asociada a la reserva de sulfuro en el cuerpo⁸. La reacción directa de sulfuro con cisteínas proteicas no es posible, requiere la presencia de un oxidante⁹. Un mecanismo propuesto para la formación de persulfuros es la reacción de sulfuro con cisteínas oxidadas, en forma de ácido sulfénico (RSOH) o disulfuro (RSSR)^{10,11} (Ecs. 6 y 7).



La posibilidad del sulfuro de ser oxidado por oxidantes biológicos¹² o centros metálicos, implica que los persulfuros puedan ser formados por la reacción de tioles con derivados de sulfuro oxidado¹³, por ejemplo en forma de HSOH o polisulfuros (HSS_nS). Los persulfuros también pueden formarse de manera radicalar, a través de la reacción del radical sulfhidrilo (HS^\bullet) con el radical tiólo (RS^\bullet), como se esquematiza en la Ec. 8, aunque la baja concentración celular de ambas especies implica que esta reacción no sea de gran relevancia biológica. El radical sulfhidrilo también puede reaccionar con un tiol no radical para dar el grupo anión radical persulfuro $RSSH^{\bullet-}$, que debe de ceder su electrón desapareado para dar el grupo persulfuro. A nivel celular, el aceptor más probable es el oxígeno molecular (O_2), rindiendo radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Ecs. 9 y 10)¹⁴. Cabe destacar que la alta reactividad de las especies radicalarias implica que existan otros mecanismos posibles, para la formación del grupo persulfuro.



Relevancia bioquímica

En altas concentraciones, el sulfuro es un gas tóxico. A nivel mitocondrial es capaz de inhibir al complejo IV de la cadena respiratoria, la enzima citocromo c oxidasa, de manera no competitiva¹⁵. De todas maneras, es producido endógenamente y se encuentra ampliamente distribuido en los tejidos de mamíferos, e incluso, a bajas concentraciones, puede actuar como donante de electrones en la cadena respiratoria¹⁶.

En el organismo se forma a partir de reacciones de eliminación de cisteína y homocisteína, catalizadas por las enzimas dependientes de PLP cistationina- β -sintasa (CBS) y cistationina- γ -liasa (CGL). El sulfuro también es producido por otra enzima, la mercaptopiruvato azufretransferasa (MST por sus siglas en inglés). En la sección siguiente profundizaremos sobre el tema. La baja polaridad de la especie protonada (H_2S) implica una capacidad de difusión alta a través de las membranas biológicas¹⁷, sin necesidad de un facilitador¹⁸. Esto permite que el sulfuro formado en una célula no quede restringido a un compartimento y que sea capaz de afectar a células vecinas.

El primer tejido donde se observó su presencia fue en el cerebro, y esto llevó a el planteamiento de su posible acción neuromoduladora, atribuída a su capacidad de activar receptores de NMDA¹⁹. Luego, su capacidad de actuar como relajante del músculo liso, así como la presencia de las enzimas encargadas de su síntesis en dicho tejido, llevó a postular que el sulfuro es capaz de actuar como vasodilatador²⁰, propiedad que luego se relacionó con su capacidad de modular la apertura de canales de potasio dependientes de ATP²¹. Se identificó su capacidad citoprotectora inicialmente en el cerebro, donde se observó que frente al estrés oxidativo, el sulfuro fue capaz de recuperar los niveles de glutatión²². Esto llevó a explorar e identificar una capacidad cardioprotectora, y se vió que el sulfuro es capaz de preservar la función mitocondrial frente a la isquemia-reperusión²³. Varias otras funciones se le han adjudicado, por ejemplo, la de modulador de la inflamación, actuando tanto como señalizador proinflamatorio²⁴ como antiinflamatorio²⁵ en distintos contextos. También se ha visto que tiene capacidad antiapoptótica^{26,27} y proapoptótica en distintos tejidos²⁸ e incluso se ha explorado su capacidad de actuar como sensor de oxígeno²⁹. Interesantemente, también se observó que el sulfuro es capaz de promover un estado de animación suspendida en ratones al disminuir el ritmo metabólico y la temperatura corporal, presumiblemente a través de la inhibición de la citocromo c oxidasa, y de la cadena respiratoria³⁰.

Uno de los mecanismos a través del cual el sulfuro es capaz de ejercer tal variedad de efectos es la modificación proteica de residuos de cisteína por persulfuración, capaz de modular la actividad de distintas proteínas blanco⁸. La persulfuración es la formación del grupo persulfuro (RSSH), que tiene una nucleofilicidad aumentada con respecto al correspondiente tiol y al sulfuro, además de la capacidad de actuar como electrófilo. Todavía se encuentra en estudio el mecanismo de formación de persulfuros a nivel celular¹⁴.

También se encuentran bajo estudio las vías endógenas de detoxificación de este compuesto, dentro de las cuales se conocen la vía de oxidación canónica de sulfuro que ocurre en la mitocondria³¹, así como su consumo por centros metálicos y otros oxidantes para formar compuestos de azufre con mayor estado de oxidación que pueden ser excretados o incluso algunos pueden funcionar como medio para ejercer sus funciones fisiológicas. Se vió que la oxidación de sulfuro por el citocromo c en la mitocondria, fue capaz de promover la persulfuración *in vivo*³². Se observó la capacidad de formación de polisulfuros por la reacción redox con metahemoglobina en la sangre³³, los cuales son capaces de modificar tioles para generar persulfuros de manera más eficiente que el sulfuro¹⁴.

Rutas de formación endógena de sulfuro

La vía de la transulfuración es una vía metabólica que involucra tanto la transferencia del átomo de azufre desde la metionina a la serina para dar cisteína, como el catabolismo del esqueleto carbonado del aminoácido metionina. Esta vía es una de las posibles rutas de consumo de la homocisteína, que es el producto de la deadenilación de la S-adenosil-homocisteína, resultante de la transferencia del grupo metilo a un aceptor del agente metilante S-adenosil-metionina (SAM). Los productos de esta vía son cisteína, α -cetobutirato y amonio, que se obtienen a partir de tres reacciones catalizadas enzimáticamente (figura 1)³⁴.

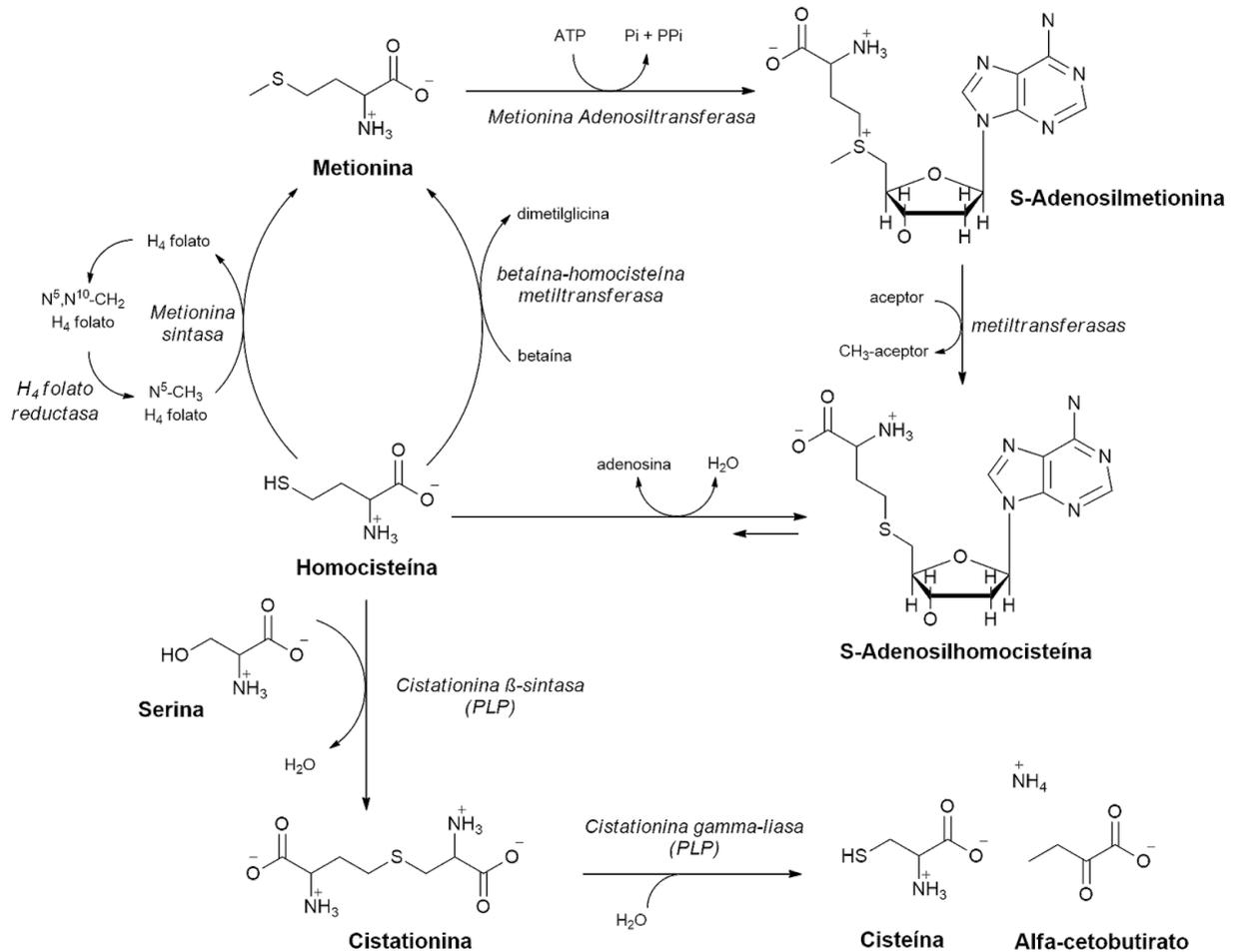


Figura 1: Esquema del metabolismo de los aminoácidos azufrados. Vía de la transulfuración, ciclo del folato y ciclo de la metionina.

La cisteína puede ser utilizada para la síntesis de proteínas, glutatión (GSH) y coenzima A, entre otros metabolitos. Cuando su consumo de la dieta supera las necesidades anabólicas, la cisteína puede seguir dos posibles rutas catabólicas: 1) puede ser oxidada a cisteína sulfinato (a partir de la cual se forma luego taurina y CO₂ por descarboxilación o, alternativamente, piruvato y sulfito por tansaminación), o 2) sufrir una reacción de transaminación para dar 3-mercaptopiruvato que puede ceder el átomo de azufre a un aceptor para dar piruvato³⁴. Estos procesos se esquematizan en la figura 2.

Entre las enzimas involucradas en la síntesis de sulfuro dos forman parte de la vía de la transulfuración (figura 1), la cistationina- β -sintasa y la cistationina- γ -liasa, mientras que la tercera, la mercaptopiruvato azufretransferasa, está implicada en el catabolismo de la cisteína (figura 2).

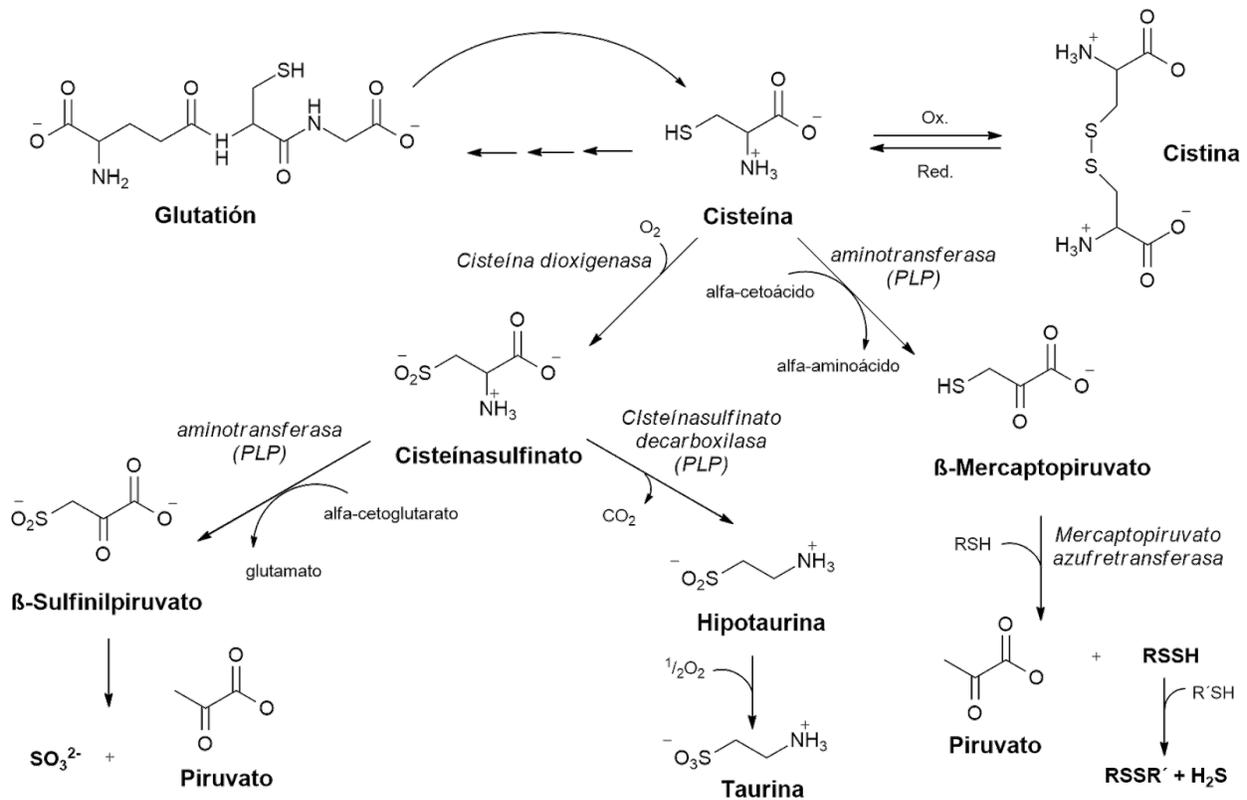


Figura 2: Metabolismo de la cisteína. Posibles rutas de catabolismo del aminoácido cisteína.

Cistationina β -sintasa (EC 4.2.1.22)

Esta enzima pertenece a la familia de las liasas, específicamente a las carbono-oxígeno liasas y es una hidroliasa ya que cataliza la rotura de un enlace C-O en la serina con la pérdida de una molécula de agua (reacción a, figura 3). Participa en el primer paso de la vía de la transulfuración, catalizando la condensación de serina con homocisteína, para dar cistationina (reacción a, figura 3), que luego en la vía conduce a la formación de cisteína (figura 1)³⁴. Esta enzima tiene una alta promiscuidad con respecto a sus sustratos y puede catalizar reacciones secundarias para generar sulfuro (figura 3). La reacción en la cual se utiliza homocisteína y cisteína es la que se da de manera mayoritaria y genera el mayor aporte de sulfuro en condiciones fisiológicas (reacción b, figura 3)³⁵. La condensación de dos moléculas de cisteína para dar lantionina, o la β -eliminación de cisteína y posterior rehidratación para dar serina (reacciones c y d, figura 3), también son reacciones generadoras de sulfuro, aunque contribuyen de forma minoritaria.

La CBS humana es un homodímero y utiliza PLP como cofactor, cada monómero tiene un cofactor hémico no catalítico al cual se le han asociado funciones reguladoras. En su forma oxidada suele ser poco reactivo, pero al ser reducido a su forma ferrosa, el hemo puede reaccionar con monóxido de carbono u óxido nítrico para producir una enzima inactiva³⁶. La

re-oxidación del hemo reducido puede darse por oxígeno molecular para dar anión radical superóxido o peroxinitrito sí se encuentra unido a óxido nítrico³⁷. Cada región carboxi-terminal de la enzima es capaz de unirse a S-adenosil metionina (SAM), que actúa como activador alostérico³⁸. Estructuras de cristalografía de rayos X han demostrado que la unión de SAM conlleva un gran rearrreglo conformacional. En la ausencia de este activador el ingreso del sustrato al sitio activo de la enzima se encuentra impedido estéricamente³⁹.

La CBS humana se localiza en el citosol de muchos tipos celulares, y también ha sido detectada en el núcleo. Se expresa mayoritariamente en hígado, páncreas, riñones y en menor proporción en el cerebro⁴⁰.

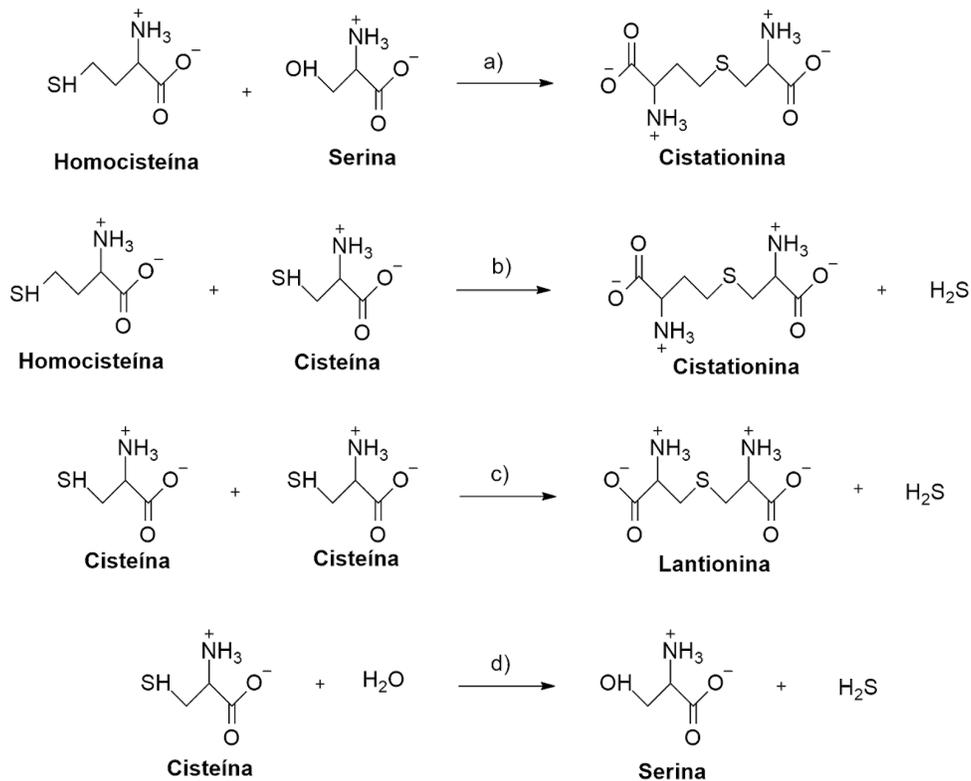


Figura 3: Reacciones catalizadas por la CBS, algunas de las cuales llevan a la formación de sulfuro. Imagen adaptada de ³⁵.

Cistationina γ -liasa (EC 4.4.1.1)

Al igual que la cistationina β -sintasa, es una liasa, pero en este caso de enlaces carbono-azufre. Esta enzima cataliza el paso siguiente en la vía de la transulfuración, la eliminación α,γ de cistationina para dar cisteína, α -cetobutirato y amonio (reacción a, figura 4). Su poca especificidad por sustratos implica que también pueda catalizar la formación de sulfuro por diversas reacciones que pueden ser dependientes de cisteína o de homocisteína (figura 4). Estudios cinéticos con concentraciones fisiológicas de cisteína y homocisteína revelaron que el 70% del sulfuro generado está dado por la escisión α,β de la cisteína (reacción b, figura 4), aunque ante el aumento en la concentración de homocisteína, como en condiciones de hiperhomocisteinemia,

las vías de mayor peso resultan ser las que utilizan a este aminoácido (reacciones d y e, figura 4)⁴¹.

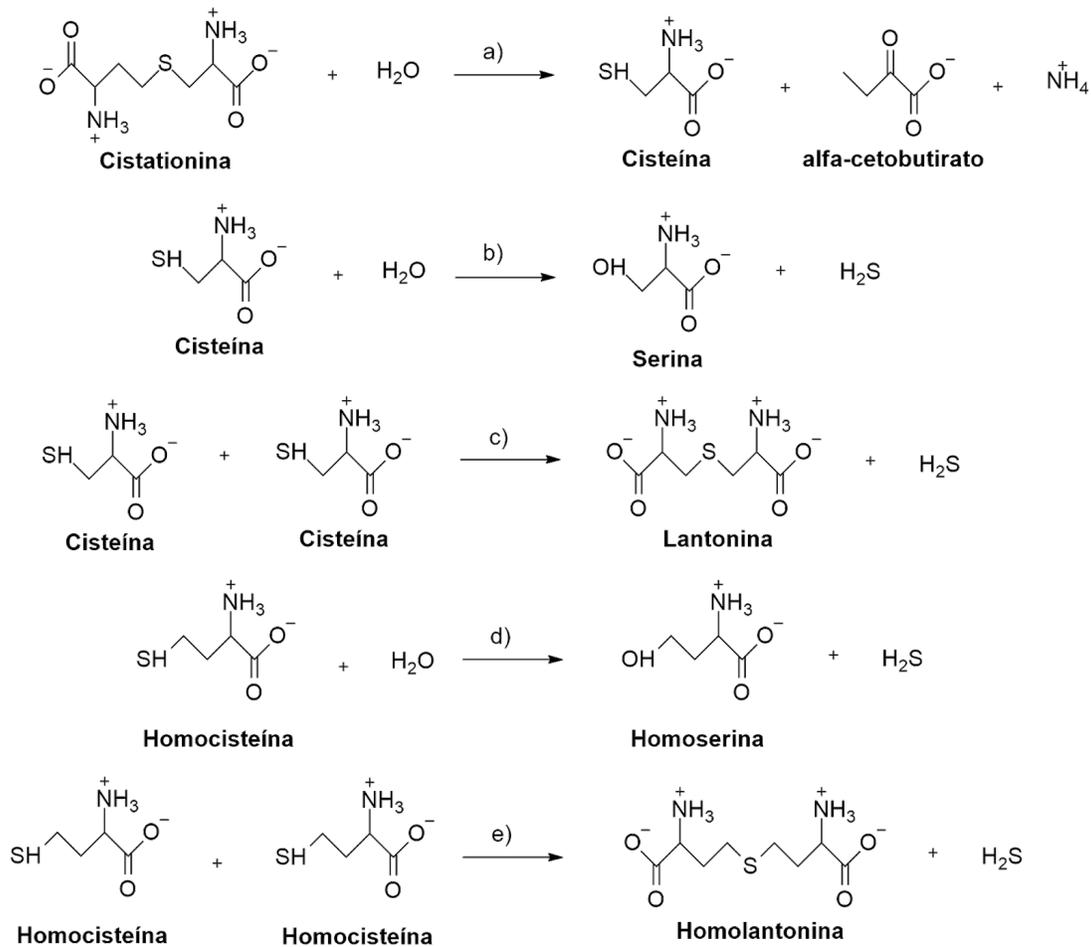


Figura 4: Reacciones catalizadas por la CGL, algunas de las cuales llevan a la formación de sulfuro. Imagen adaptada de⁴¹.

Al igual que la CBS, la CSE es una enzima que utiliza PLP, y sus mecanismos catalíticos son muy parecidos. El cofactor actúa estabilizando a los sustratos de manera de promover su desprotonación y la estabilización de un intermediario carbaniónico⁴². Es un homotetrámero en el que el cofactor PLP se encuentra unido a través de una base de Schiff con un residuo de lisina y estabilizado electrostáticamente por el grupo piridinio de una asparagina⁴³. Tiene actividad mayoritariamente en el hígado y riñón⁴⁴ y se ha visto que es la fuente principal de sulfuro en el cuerpo carotídeo²⁹. Su localización subcelular ha sido estudiada en hígado y riñón de rata y es mayoritariamente citosólica⁴⁵.

Poco se conoce sobre la regulación de esta enzima, se ha visto que es capaz de ser regulada por monóxido de carbono al igual que la CBS, pero al no tener un grupo prostético hemo, el mecanismo es diferente. Se propone que el monóxido de carbono, cuya producción en el cuerpo carotídeo se encuentra altamente relacionada con la disponibilidad de oxígeno sanguíneo, es capaz de activar a la proteína quinasa G, que se vió, puede fosforilar uno de los residuos de serina

de la CSE, inhibiendo su actividad y la formación de sulfuro⁴⁶. Ya que bajas en la concentración de oxígeno sanguíneo llevan a una disminución en la concentración de CO y por ende a un aumento en la producción de sulfuro por la CSE, este podría ser uno de los mecanismos que explica el posible rol del sulfuro como sensor de oxígeno²⁹.

3-Mercaptopiruvato azufretransferasa (EC 2.8.1.2)

Esta enzima se encuentra implicada en el catabolismo de la cisteína (figura 2). Pertenece a la familia de las azufretransferasas, que catalizan la transferencia de un azufre desde un dador hacia un aceptor tiofílico mediante la formación de un intermediario persulfuro en una de las cisteínas enzimáticas. En el caso de la MST el dador del átomo de azufre es el 3-mercaptopiruvato y los aceptores pueden ser varios⁴⁷, aunque el que se ve favorecido cinéticamente en condiciones fisiológicas es la tiorredoxina⁴⁸. El 3-mercaptopiruvato es formado a través de una reacción de transaminación de la cisteína catalizada por la cisteína aminotransferasa o la aspartato aminotransferasa (GOT) (figura 5)⁴⁹.

La reacción catalizada por la MST no genera sulfuro *per se*, ya que lo que cataliza es la transferencia de un átomo de azufre. Se propone un mecanismo en el cual el átomo de azufre del 3-mercaptopiruvato es primeramente aceptado por una cisteína de la enzima MST para dar un persulfuro proteico, y luego de liberar piruvato, la enzima es capaz de reaccionar con un aceptor, el cual toma el átomo de azufre para formar el producto. Cuando el aceptor es un tiol, el producto es un persulfuro que a través de una reducción puede dar sulfuro, como se muestra para el caso de la tiorredoxina en la figura 5. En este caso la reducción de grupo persulfuro implica la formación de un disulfuro intramolecular por parte de la tiorredoxina⁴⁸.

Su actividad se ha localizado mayoritariamente en riñón, hígado y corazón de mamíferos⁴⁴. Un estudio extensivo de su localización tisular y celular confirmó su presencia en estos tejidos así como en el cerebro⁵⁰. Existen dos variantes humanas para esta enzima, una es exclusivamente citosólica mientras que otra es tanto citosólica como mitocondrial. Ambas isoformas se originan a partir del mismo gen y su diferenciación está dada por un splicing alternativo que implica que una isoforma tenga 20 aminoácidos más que la otra, pero sus características cinéticas son iguales para la reacción de transferencia de azufre desde mercaptopiruvato hacia DTT o cianuro⁵¹.

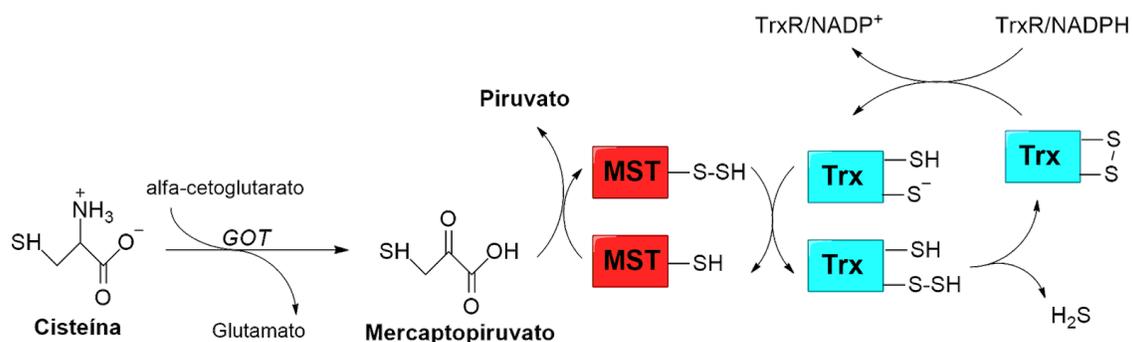


Figura 5: Ciclo catalítico de producción de sulfuro a partir de cisteína, imagen adaptada de⁵².

Formación intestinal de sulfuro

Algunas bacterias intestinales utilizan sulfato como aceptor final en su cadena respiratoria y producen sulfuro como producto metabólico principalmente en el colon, lo que implica que existe una fuente adicional de sulfuro en este tejido, además de la producción basal que se da en las células intestinales a partir de la acción de la CBS y CSE⁵³.

Las comunidades microbianas son una parte integral del tracto gastrointestinal humano, se encuentran implicadas en la digestión, producción de vitaminas y nutrientes e incluso cumplen roles relacionados con la inmunidad de dichas mucosas^{54,55}. La fermentación bacteriana de carbohidratos genera grandes cantidades de hidrógeno, que puede ser utilizado por distintos tipos de bacterias hidrogenótrofas, dentro de las cuales se encuentran las bacterias reductoras de sulfato, que a través de la vía disimilatoria de reducción de sulfato generan sulfuro (figura 6) siendo ésta la vía mayoritaria de producción de sulfuro en el lumen intestinal⁵⁶. Las fuentes de azufre incluyen aminoácidos azufrados de la dieta (metionina y cisteína) que alcancen el intestino grueso, sulfato inorgánico y aditivos alimenticios⁵⁷. Adicionalmente polisacáridos azufrados como sulfumucinas componentes de la capa protectora del epitelio intestinal colónico, se ha visto, también son sustratos para la producción de sulfuro en el intestino⁵⁸.

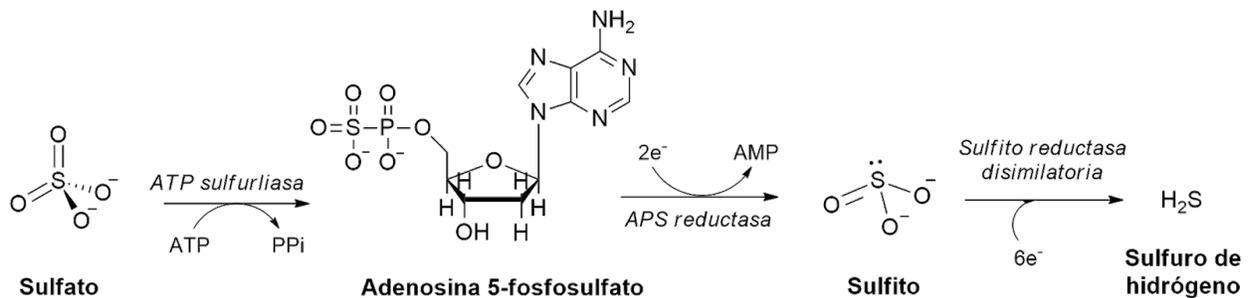


Figura 6: Vía disimilatoria de reducción de sulfato por bacterias reductoras de sulfato intestinales, imagen adaptada de ⁵⁶.

Se han reportado valores de 1000 ppm de sulfuro en intestino ciego de ratón⁵⁹ y hasta 30 ppm en flatulencias humanas⁶⁰. La hidrofobicidad del H₂S permite su difusión a través de las membranas celulares¹⁷, lo que implica que los colonocitos son células altamente expuestas a grandes concentraciones de este gas, por lo que dichas células epiteliales colónicas, necesariamente, se encuentran adaptadas a través de mecanismos de detoxificación muy eficientes^{61,62}. Un ejemplo de esto es un mecanismo de regulación metabólica particular de la sulfuro-quinona oxidoreductasa (SQR) en los colonocitos, además de actuar en la vía canónica mitocondrial de detoxificación de sulfuro, descrita más adelante, esta enzima es capaz de generar la molécula reguladora persulfuro de coenzima A (Co-ASSH), a partir de sulfuro y Co-A, que actúa como inhibidora de la oxidación de butirato, promoviendo la utilización de sulfuro como fuente energética, y por ende, su detoxificación⁶³.

Las bacterias reductoras de sulfato son las encargadas de generar el 50% de sulfuro que se encuentra en los colonocitos, mientras que el 50% restante se genera de manera PLP dependiente, por lo que se adjudica a la acción de las enzimas CBS y CSE⁶⁴.

Rutas de consumo de sulfuro

A pesar de la amplia distribución de las tres enzimas capaces de generar sulfuro en los tejidos de mamíferos, la concentración de este modulador se mantiene a niveles del orden nanomolar⁶⁵. Como se mencionó previamente, la toxicidad asociada al sulfuro está dada por su capacidad de inhibir a complejo IV de la cadena respiratoria, con una concentración de sulfuro necesaria para la mitad de la inhibición máxima de $20 \mu\text{M}$ en cultivos celulares⁵³ y $0,2 \mu\text{M}$ para la enzima aislada⁶⁶. Por esta razón, es importante controlar su concentración en el estado estacionario, lo que se da a través de rutas de detoxificación endógenas muy eficientes. Estas vías acentúan su relevancia en los tejidos del intestino, donde el consumo del sulfuro producido por la microbiota debe constituirse en una barrera muy eficiente.

Una de las estrategias para evitar el acúmulo de sulfuro es a través de su consumo por la ruta de oxidación canónica, que ocurre en la mitocondria y se encarga de convertir sulfuro en tiosulfato y sulfato³¹. Otra posible ruta de consumo es su oxidación por globinas, para dar tiosulfato e hidropolisulfuros proteicos^{33,67} esto es posible gracias a la reactividad del sulfuro con centros metálicos, en este caso con el grupo hemo.

Ruta mitocondrial de oxidación de sulfuro

En esta vía se da la oxidación completa del sulfuro a sulfato, que implica 8 electrones. La primera enzima involucrada es la sulfuro quinona oxidoreductasa, que cataliza la transferencia de dos electrones desde el sulfuro a la coenzima Q. De esta manera, se conecta al sulfuro con la cadena respiratoria, ya que la coenzima Q reducida ingresa a nivel del complejo III impulsando la síntesis de ATP. El azufre es oxidado por esta enzima y se transfiere a una molécula aceptora, que puede ser GSH o sulfito, formando glutatión persulfuro (GSSH) o tiosulfato, respectivamente. La naturaleza del aceptor es discutida y, dependiendo de cuál sea, se siguen dos posibles caminos para la oxidación del azufre, que se esquematizan en la figura 7. Luego intervienen transferasas como la rodanasa y oxidasas como la persulfuro dioxigenasa y la sulfito oxidasa. Los productos finales principales, sulfato y tiosulfato son más inocuos que el sulfuro.⁴²

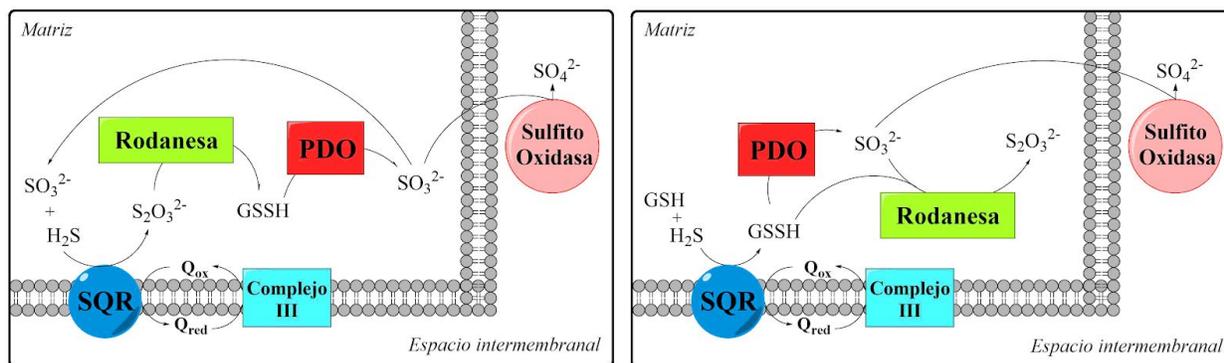


Figura 7: Esquema de los dos modelos alternativos para la oxidación mitocondrial de sulfuro. Imagen adaptada de ⁴².

Sulfuro quinona oxidoreductasa (EC 1.8.5.8)

Esta enzima se encuentra clasificada como una oxidoreductasa y pertenece a la familia de las flavoproteínas disulfuro oxidoreductasas. Se encuentra en la membrana interna mitocondrial y

depende de un par de cisteínas y de FAD para catalizar la transferencia de 2 electrones desde el sulfuro hacia la cadena de transporte de electrones (figura 8). Es tanto una azufretransferasa como una oxidoreductasa, ya que cataliza la transferencia de un átomo de azufre a un aceptor y a su vez la transferencia de electrones desde el sulfuro hacia el FAD y luego a la coenzima Q. El mecanismo propuesto para la acción de esta enzima implica la presencia de un disulfuro catalítico formado entre dos de sus cisteínas, capaz de ser atacado por el HS^- para dar un persulfuro proteico, luego un aceptor tiofílico podría atacar dicho persulfuro enzimático, tomando el átomo de azufre para formar el producto correspondiente. Seguidamente, se da la re-formación del enlace disulfuro de la enzima junto con la reducción del cofactor FAD para completar la primera mitad de la reacción de óxido-reducción. En la segunda mitad del ciclo, el FAD se oxida a expensas de la reducción de la coenzima Q (figura 8)⁶⁸. Recientemente, estructuras por cristalografía de rayos X han revelado la presencia de un trisulfuro entre dos cisteínas de la enzima en reposo, lo que llevó a proponer un mecanismo catalítico en el cual el estado activo de la enzima implica un trisulfuro inicial en vez de un disulfuro y que el mecanismo ocurre a través del ataque de HS^- a dicho trisulfuro y formación de dos persulfuros en ambas cisteínas catalíticas⁶³.

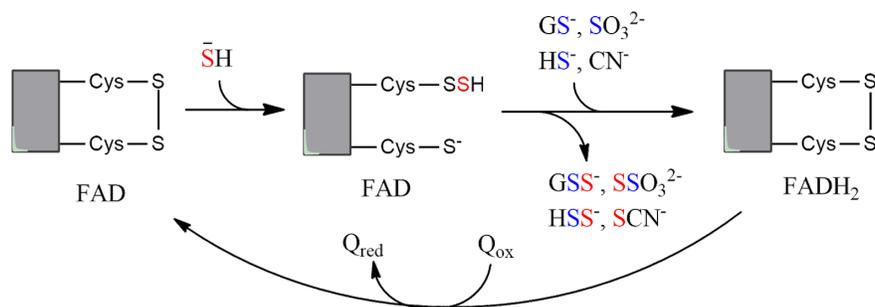


Figura 8: Esquema del ciclo catalítico de la SQR. La utilización de distintos aceptores, como GSH, SO_3^{2-} , sulfuro o cianuro, genera distintos productos, glutatión persulfuro (GSS^-), tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$), HS_2^- y tiocianato (SCN^-) respectivamente. Imagen adaptada de⁴².

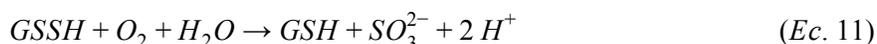
La identidad del aceptor tiofílico se encuentra bajo discusión. *In vitro*, la enzima es capaz de utilizar numerosos aceptores (figura 8), pero *in vivo* los mejores candidatos son GSH y sulfito. Si bien la enzima tiene una constante catalítica (k_{cat}) mayor con el sulfito, el mayor valor de K_M para este sustrato con respecto al GSH hacen que la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) sea mayor para GSH⁶⁹. Además, el GSH se encuentra en concentraciones mucho mayores que el sulfito en la célula. Una evidencia indirecta a favor del GSH como aceptor preferencial de la SQR, haciendo foco en la vía de detoxificación, es una mayor eficiencia catalítica para una enzima posterior en la vía, la rodanasa, por el producto glutatión persulfuro, versus el producto de la utilización de sulfito como aceptor de la SQR, tiosulfato⁶⁹. En conclusión, la reacción se puede dar por ambos caminos, parece ser que el GSH sería el aceptor preferido bajo condiciones fisiológicas, mientras que, en condiciones patológicas de exceso de sulfito, la SQR puede priorizar su consumo, aportando a su detoxificación. Esto explica la alta excreción de tiosulfato en personas con deficiencia en la enzima sulfito oxidasa⁷⁰.

La posibilidad de utilizar a la coenzima A como aceptor alternativo, dando persulfuro de coenzima A (CoA-SSH), que tiene acciones inhibitorias sobre enzimas relacionadas a la

β -oxidación, le agrega a esta enzima una posible función regulatoria, dependiente de sulfuro, en el metabolismo en los colonocitos⁶³.

Persulfuro dioxigenasa (EC 1.13.11.18)

Esta enzima es una oxidorreductasa que incorpora dos átomos de oxígeno a un aceptor. Cataliza la oxidación de glutatión persulfuro para dar sulfito y GSH, utilizando oxígeno molecular como sustrato oxidante (Ec. 11). Si bien ya se había reconocido la presencia de una azufredioxigenasa en la ruta de oxidación canónica de sulfuro en extractos celulares³¹ fue la implicancia de esta enzima en una enfermedad de origen genético lo que llevó a su descubrimiento⁷¹. Mutaciones que provocan la malfunción de esta enzima son las causantes de la encefalopatía etilmalónica, en la cual las altas concentraciones de sulfuro dadas por defectos en la actividad de esta enzima, son las encargadas de la sintomatología^{72,73}. Se propone que en ausencia o disminución de la actividad de esta enzima, la ruta de oxidación canónica se ve afectada, llevando a una oxidación ineficiente y acumulación de sulfuro⁷¹. Dado a que esta enzima es dependiente de oxígeno, su actividad disminuirá en condiciones de hipoxia, generando un aumento en la concentración intracelular de sulfuro⁷⁴. Es por esto que también se la relaciona con los efectos sensores de oxígeno que se le atribuyen al sulfuro.



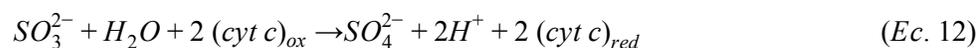
Rodanesa (EC 2.8.1.1)

Al igual que la MST, esta enzima desarrolla actividad azufretransferasa, siendo capaz de utilizar varios sustratos. Se ha demostrado que contiene actividad tiosulfato:cianuro, GSSH:sulfito y tiosulfato:GSH azufretransferasa. Fue descubierta por su implicancia en la detoxificación de ión cianuro (CN⁻) para dar tiocianato, con tiosulfato como el dador de azufre⁷⁵. Al igual que la MST, es una enzima con mecanismo de doble-desplazamiento o ping-pong, en el cual primeramente reacciona con el dador del átomo de azufre, se modifica covalentemente a través de la formación de un persulfuro cisteínico, y luego reacciona con el aceptor cediendo el átomo de azufre. Los valores cinéticos para la reacción de transferencia de azufre desde tiosulfato hacia el ión cianuro para esta enzima no apoyan su rol en la detoxificación de cianuro, ya que el valor de eficiencia catalítica es de tres órdenes de diferencia mayor para el par GSSH/S₂O₃²⁻ que para S₂O₃²⁻/CN⁻ y que el K_M para el CN⁻ de la rodanesa es del orden de su K₁⁷⁶.

Se ha hecho un extenso estudio cinético con distintos aceptores y dadores de azufre, el cual reveló que la enzima humana tiene el valor de k_{cat}/K_M mayor cuando utiliza glutatión persulfuro como dador y sulfito como aceptor⁷⁶, pero el sentido de la transferencia de azufre por la rodanesa *in vivo* va a depender también de las concentraciones relativas de dichos sustratos y de la constante de equilibrio.

Sulfito oxidasa (EC 1.8.3.1)

Esta enzima es una oxidorreductasa que cataliza la transferencia de dos electrones desde el sulfito hacia el citocromo c, con la subsecuente adición de un átomo de oxígeno al sulfito, proveniente del agua (Ec. 12). En humanos es una enzima soluble ubicada en el espacio intermembranal mitocondrial que utiliza un cofactor de molibdeno y un hemo para su catálisis⁷⁷.



Existe una aceptación generalizada para el mecanismo de catálisis de esta enzima. Se propone que el sulfito es oxidado a sulfato en el centro molibdeno. A continuación, los electrones pasan al hemo de la enzima para luego ser transferidos a dos moléculas de citocromo c oxidado. En la primera mitad del ciclo catalítico el sulfito reduce al molibdeno de la enzima, desde Mo(VI) a Mo(IV) con la subsecuente liberación de sulfato. Seguidamente, ocurre una transferencia electrónica interna en la enzima, en la cual el molibdeno completamente reducido le transfiere uno de sus electrones al grupo hemo, para dar el intermediario Mo(V)/Fe(II) detectado por EPR⁷⁸. En la segunda mitad de la reacción, primero se da la transferencia de un electrón hacia el citocromo c que abandona la enzima al reoxidar al hemo. Luego se transfiere el otro electrón proveniente del sulfato, desde el Mo(V) hacia el hemo oxidado, en una segunda transferencia electrónica interna, y seguidamente a otra molécula de citocromo c para cerrar el ciclo catalítico⁷⁷.

Oxidación de sulfuro por hemoproteínas

La reactividad del sulfuro implica que éste pueda reaccionar con centros metálicos, ya sea a través de la unión covalente, coordinación o interacción redox. Este tipo de reactividad constituye un mecanismo alternativo de detoxificación del sulfuro en los glóbulos rojos, donde, al no haber mitocondrias, no es posible la oxidación de sulfuro por la vía canónica descrita anteriormente³³.

Lo primero que se observó fue la interacción entre el sulfuro y la hemoglobina con el grupo hemo en su forma reducida y oxigenada (OxiHb-Fe(II)) lo que lleva, en determinadas condiciones, a la modificación covalente del anillo tetrapirrólico del hemo para dar el compuesto verde sulfohemoglobina⁷⁹, en el que la afinidad por el oxígeno disminuye significativamente con respecto a la proteína nativa⁸⁰. El sulfuro puede generar este tipo de modificación covalente también con otras proteínas, como la mioglobina o catalasa⁸¹. Esta modificación irreversible no sería eficiente en la oxidación catalítica de sulfuro, más bien se encuentra implicada en la toxicidad asociada al mal uso de drogas sulfas (sulfonamidas)⁸², ya que el producto sulfohemoglobina no puede ser reconvertido en la proteína nativa por mecanismos naturales en los glóbulos rojos.

La metahemoglobina, el estado oxidado de la hemoglobina, en el cual el hierro se encuentra en la forma Fe(III), puede reaccionar reversiblemente con sulfuro para dar un compuesto con picos de absorción a 578 y 545 nm⁸³, presuntamente un intermediario MetHb Fe(III)-SH⁻ confirmado posteriormente por cristalografía⁸⁴. La metahemoglobina se produce por autooxidación de la hemoglobina y en condiciones fisiológicas normales representa aproximadamente el 1-3% de la hemoglobina total. Se observó que la condición patológica denominada metahemoglobinemia, en la cual los niveles de metahemoglobina se encuentran por encima de lo normal, es capaz de proteger frente a la intoxicación por sulfuro⁸⁵. Recientemente se realizó un estudio extensivo del rol de la metahemoglobina en la oxidación de sulfuro en los glóbulos rojos, en el cual se demostró que en estas células se da la oxidación de sulfuro a tiosulfato y polisulfuros de

hemoglobina en los cuales el azufre se encontraba unido al hierro³³. Eventualmente es capaz de reducir a la metahemoglobina en presencia de oxígeno a hemoglobina Fe(II).

Se han estudiado varios casos de transferencia de un electrón entre sulfuro y hemoproteínas oxidadas. En estos casos, el hemo en forma de Fe(III) puede reducirse a su forma ferrosa (Fe(II)) y, en presencia de oxígeno, dar tiosulfato y polisulfuros coordinados al hemo como productos finales oxidados del sulfuro⁸⁴. La óxido-reducción puede darse a través de la formación de los intermediarios Fe(III)-SH⁻ si la hemoproteína tiene disponibilidad de coordinación, pero no siempre que se da la coordinación hay una reacción de transferencia de electrones. Se propone que la capacidad de ser reducida por el sulfuro, luego de la formación del intermediario Fe(III)-SH⁻, está dada por la polaridad del entorno hémico de la proteína. Las hemoproteínas con grupos aceptores de enlaces de hidrógeno cercanos al hierro, capaces de generar interacciones con el ligando SH⁻ son más propensas a la reducción, mientras que si el entorno hémico es apolar, se ve favorecida la disociación de sulfuro sin la concomitante reducción⁸⁶. La reducción por un electrón del hierro conlleva a la formación de radical sulfhidrilo (HS[•]) que fue atrapado con 5,5'-dimetil -1-pirrolina *N*-óxido (DMPO) en la reacción de sulfuro con una porfirina de hierro modelo. En base a este resultado, se propone que el intermediario Fe(III)-SH⁻ se encuentra en equilibrio con la especie Fe(II)-HS⁻⁸⁷. La transferencia de electrones con sulfuro también ha sido reportada para hemoproteínas en las cuales hierro se encuentra hexacoordinado, *a priori*, sin disponibilidad para la formación de un enlace Fe-S, como en la neuroglobina y el citocromo c. En estos casos también se identificó al tiosulfato y distintos polisulfuros como productos^{32,88}.

Una de las interacciones más estudiadas entre sulfuro y una metaloproteína, de relevancia médica, es con el complejo IV de la cadena respiratoria, cuya inhibición es la encargada de la toxicidad del sulfuro. A bajas concentraciones, el sulfuro es capaz de reducir uno de los centros metálicos de esta enzima sin inhibirla, mientras que a concentraciones mayores, se coordina a uno de los grupos hemo en su forma férrica, inhibiendo la actividad enzimática⁸⁹.

Concentraciones de sulfuro en tejidos mamíferos

A pesar de la gran evidencia a favor de la formación de sulfuro en distintos tejidos de mamíferos, su concentración *in vivo* ha sido un debate por un largo tiempo, debido a valores reportados no concordantes. Estudios iniciales reportaron concentraciones en el rango milimolar en el plasma y cerebro, mayores a 35 μM y 50-160 μM respectivamente⁹⁰, pero múltiples críticas han llevado al cuestionamiento de estos valores. La naturaleza del sulfuro implica posibles errores en su medición asociados a su volatilización u oxidación. Se constató que técnicas de manipulación de las muestras como la alcalinización, acidificación o reducción, son capaces de promover el desplazamiento de las reservas lábiles de azufre, por ejemplo, la acidificación comúnmente utilizada en varias técnicas analíticas es capaz de liberar sulfuro de clusters ferrosulfurados, así como la adición de reductores como DTT libera sulfuro de compuestos con azufres sulfanos⁹¹. El uso de métodos altamente sensibles, junto con un mayor rigor en el tratamiento de muestras, ha llevado a la determinación de valores de sulfuro en la sangre < 100 nM⁹² y de 10, 15 nM en hígado y riñón murino⁶⁵. Este rango de valores de concentraciones de sulfuro fue apoyado por estimaciones de su concentración en el estado estacionario a partir de sus velocidades de

formación y consumo en hígado, riñones y cerebro murino, que resultaron encontrarse dentro del rango de 9-29 nM⁹³.

Métodos de cuantificación de sulfuro

Existen varios tipos de aproximaciones reportadas para la detección de sulfuro, y se suelen basar en su nucleofilicidad o en su capacidad reductora. Alternativamente, la baja solubilidad de algunos compuestos metálicos de sulfuro se ha utilizado como estrategias de detección a través de la precipitación de metales. La naturaleza gaseosa del sulfuro de hidrógeno, así como su alta reactividad, implican grados de dificultad en su detección. La similitud entre la reactividad del sulfuro y la de los tioles, desde el punto de vista nucleofílico y reductor, representa un problema para la selectividad de los métodos de detección. Los modelos de estudio biológicos suelen contener una variedad de tioles en altas concentraciones (glutación y tioles proteicos en niveles supramilimolares, entre otros) y estos interferentes pueden enmascarar fácilmente la señal desarrollada por el sulfuro. Todos los métodos actuales presentan desventajas, y debido a la relevancia que ha alcanzado el sulfuro como posible modulador fisiológico, el desarrollo de nuevos métodos de detección se encuentra en auge.

Ambas especies desprotonadas del sulfuro de hidrógeno, HS⁻ y S²⁻, son capaces de absorber en la región ultravioleta, específicamente a 230 nm con coeficientes de extinción molar de 8.0×10^3 and $4.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectivamente, a 25 °C⁹⁴, por lo cual teóricamente se podría medir la concentración por absorbancia a 230 nm de soluciones alcalinas de sulfuro en las cuales la especie predominante sea HS⁻. En la práctica, sus productos de oxidación generan interferencias, así como muchas otras moléculas, ya que es una región del espectro donde suelen absorber.

Los métodos instrumentales clásicos de medida de sulfuro incluyen la cromatografía de gases, polarografía y electrodos sensibles al sulfuro⁹⁵. Para la utilización de estas técnicas las muestras deben de ser homogeneizadas. Tanto la cromatografía de gases como los métodos polarográficos detectan sulfuro de la fase gaseosa, por lo que se precisan de medidas de pH acertadas para determinar la concentración de sulfuro en la solución en condiciones fisiológicas.

Una metodología para el tratamiento de las muestras comúnmente usada es el atrapado de sulfuro en partículas de ZnS a través de su reacción con acetato de zinc, con el fin de evitar la pérdida de sulfuro en la fase gaseosa. Al momento de realizar la reacción de detección, se da su liberación a través de la acidificación del medio. Esta técnica se utiliza en conjunto con varios de los métodos descritos a continuación.

Métodos basados en su capacidad reductora

Se ha explotado la capacidad del sulfuro de reducir grupos azida o nitro como método para la detección química del sulfuro, habiéndose desarrollado numerosas sondas fluorescentes basadas en estas reacciones^{96,97}. Estos métodos generalmente involucran la reducción de grupos azida o nitro, que se encuentra acoplada a la activación de un fluoróforo (figura 9). Se suelen utilizar soportes derivatizados de rhodaminas, dansilos, cumarinas o naftilamidas. Tienen como desventaja una cinética lenta y la interferencia por otras moléculas reductoras. Si bien

tanto glutatión como cisteína tienen potenciales de reducción mayores que el sulfuro, la cinética de reducción de azidas y nitros por sulfuro es más rápida, lo que permite una selectividad de estas sondas hacia dichos tioles moderadamente buena⁹⁵. Otro detalle a tener en cuenta con este tipo de métodos, es que los productos de reducción por sulfuro o tioles son idénticos, dificultando la medida precisa de sulfuro a no ser que se puedan determinar las concentraciones exactas de tioles en las muestras.

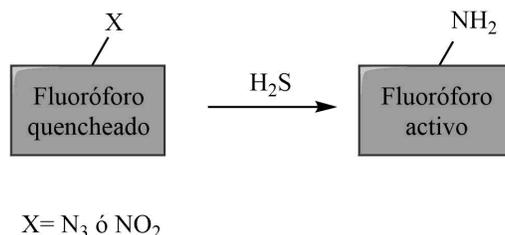


Figura 9: Esquema representativo del mecanismo de detección de sulfuro por reducción de azidas o nitros. Imagen adaptada de⁹⁵.

Algunos métodos electroquímicos también utilizan como base esta capacidad del sulfuro. Un método polarográfico se basa en la oxidación de sulfuro por ferricianuro⁹⁸. Este método permite la difusión selectiva de sulfuro a través de una membrana, donde entra en contacto con una solución alcalina de ferricianuro de potasio. El ferricianuro es primeramente reducido por el sulfuro, y luego es reoxidado electroquímicamente con su concomitante cuantificación. Esta metodología permite medidas en tiempo real de la concentración de sulfuro, pero la respuesta no es instantánea, por lo que no se pueden utilizar para medidas cinéticas rápidas. Alcanzan sensibilidades de hasta 10 nM, pero la fuga de sulfuro es un problema mayor, así como interferencias generadas por otras especies reductoras capaces de atravesar la membrana.

Para estandarizar soluciones stock de sulfuro se utilizan valoraciones iodimétricas, en las cuales primeramente se atrapa el sulfuro en partículas de ZnS y luego se hace reaccionar con exceso de iodo en medio ácido. El iodo remanente se titula con tiosulfato de sodio utilizando almidón como indicador. De todas maneras, la presencia de otros reductores puede generar errores en las medidas⁴².

Métodos basados en su capacidad de unirse a cationes metálicos

Un método gravimétrico clásico para la detección de cobre, consta en la precipitación de sulfuro de cobre (CuS) luego de su reacción con sulfuro. En base a esta reacción se han desarrollado sondas que contienen un fluoróforo que se encuentra quencheado por la unión de un átomo de Cu(II). La incubación con sulfuro genera una precipitación del CuS, lo que implica que el cobre abandone la sonda y se encienda la fluorescencia⁹⁹. Es importante en este tipo de metodología evitar la reducción de Cu(II) a Cu(I) por tioles, ya que esto implicaría un cambio en la geometría de la coordinación que podría promover la expulsión del metal. Minimizar este tipo de reacciones es necesario para mantener la selectividad hacia el sulfuro sobre los tioles. Existen muchos ejemplos de sondas que utilizan como base esta característica del sulfuro para su detección^{100,101} pero existen varias limitaciones prácticas para estas metodologías, por ejemplo se deben de controlar las concentraciones de la sonda, ya que la precipitación de CuS se da de manera estequiométrica, también son necesarios controles de reactividad hacia tioles para que sean

biocompatibles, e incluso hacia otros reductores biológicos o metales como el Zn^{2+} para asegurar que no se dé el intercambio en la coordinación.

Métodos basados en su nucleofilicidad

Además de su capacidad reductora, como vimos anteriormente, el sulfuro también es un potente nucleófilo. A pH fisiológico se encuentra mayoritariamente en su forma desprotonada (HS^-), más reactiva, mientras que los tioles predominan en su forma protonada (RSH). Esta diferencia implica ciertas ventajas en la nucleofilicidad del sulfuro frente a los tioles en condiciones fisiológicas. Muchos métodos desarrollados hasta el día de hoy explotan esta capacidad del sulfuro, así como su doble nucleofilicidad para detectarlo y cuantificarlo⁹⁵.

La nucleofilicidad del sulfuro se ha explotado, por ejemplo, en métodos que se basan en la disrupción de sistemas π extendidos por su adición nucleofílica a los mismos, de manera de modificar la emisión fluorescente, como se muestra para la sonda CouMC en la figura 10¹⁰². Estos métodos constan de sondas con resonancia extendida (sistemas π extendidos), por ejemplo, con regiones aromáticas unidas por dobles enlaces conjugados. Estas sondas tienen una fluorescencia característica, la adición de sulfuro a alguna región electrófila interrumpe la resonancia de la sonda, variando dicha emisión¹⁰³. Estas pruebas radiométricas se han utilizado para medir sulfuro en células, incluso una de ellas, selectivamente en la mitocondria¹⁰². Posibles desventajas de este tipo de métodos están dadas por la interferencia de otros tioles, ya que inicialmente este tipo de sondas fueron desarrolladas para la detección de tioles¹⁰³.

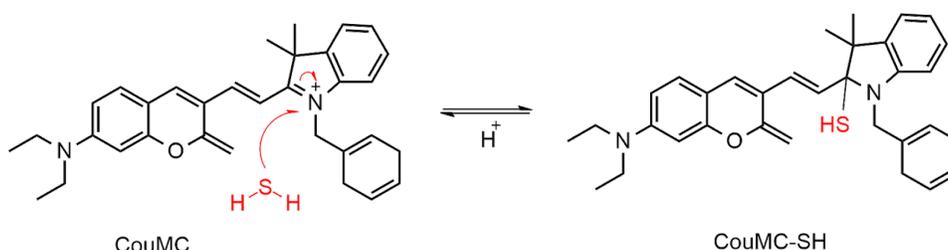


Figura 10: Reacción de la sonda CouMC con sulfuro y su recuperación alcalina. La adición de sulfuro a la molécula implica una disrupción en la resonancia de la misma, generando un cambio en la fluorescencia dependiente de la concentración de sulfuro. Imagen adaptada de¹⁰²

Existen también varias sondas fluorescentes que aprovechan la doble reactividad del sulfuro dentro de la misma molécula para generar primeramente un tiol a partir de la reacción del sulfuro con un grupo electrófilo, que luego puede reaccionar con otro electrófilo intramolecular y generar una respuesta fluorescente⁹⁵. Un ejemplo de esto es un enfoque que utiliza una doble adición de Michael, por ejemplo en la utilización de una sonda con un grupo aldehído y otro grupo acrilato, en el cual el sulfuro primero reacciona con el aldehído para formar un hemitioacetal, que luego sufre otra adición de Michael con el acrilato para formar un tioacetal en el cual la fluorescencia se ve aumentada (figura 11)¹⁰⁴. Otro enfoque es la utilización de sondas con un grupo fluorogénico unido a través de un enlace acrilato, en la cual una segunda adición de Michael intramolecular con el grupo acrilato, genera la rotura del enlace que conecta el fluoróforo, eliminándolo de la sonda y encendiendo la emisión fluorescente de la misma¹⁰⁵.

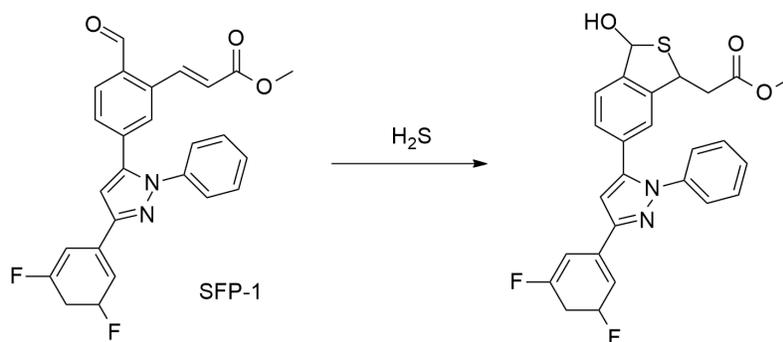


Figura 11: Doble reacción intramolecular de sulfuro con la sonda SFP-1, imagen adaptada de¹⁰⁴.

Uno de los métodos más ampliamente utilizados es la derivatización por monobromobimano, que se basa en la doble reactividad del sulfuro, en este caso con monobromobimano para dar el producto fluorescente sulfuro dibimano (figura 12). Este método fue originalmente desarrollado para la detección de tioles, ya que el producto de la monoreacción con tioles también es fluorescente. Es por esto que para la cuantificación de sulfuro es necesario un paso de separación de los productos, generalmente por HPLC. Este método no puede ser utilizado para la medida de sulfuro en tiempo real, pero tiene la ventaja de un límite de detección de 2 nM¹⁰⁶.

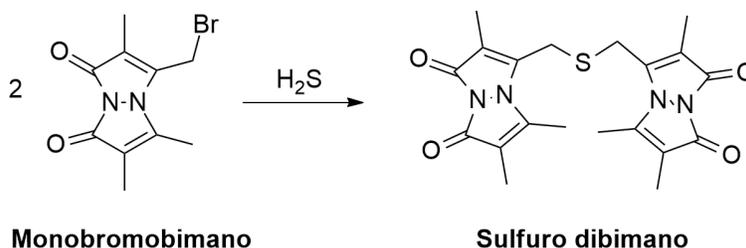


Figura 12: Reacción de dos moléculas de monobromobimano para dar el derivado sulfuro dibimano, base del método de detección de sulfuro por derivatización de monobromobimano.

La explotación de la doble nucleofilicidad del sulfuro tiene como ventaja una selectividad en la detección sobre tioles, pero se debe de asegurar que el mecanismo de detección no sea inactivado por la reacción de la sonda con tioles. El desarrollo de sondas que reaccionen de manera reversible con los tioles y con mayor velocidad con el sulfuro es el desafío de este tipo de métodos.

Azul de metileno

Este es un método usado comúnmente, se considera una metodología estándar en análisis ambiental. Se basa en la formación de azul de metileno a partir de sulfuro y N,N-dimetil-*p*-fenilendiamina. La reacción se da en medio ácido y en presencia de cloruro férrico (figura 13)¹⁰⁷.

Esta reacción requiere 20 minutos de incubación, luego de la cual se mide la absorbancia a 670 nm y se compara contra una curva de calibración. Dentro de las desventajas que presenta este método, están las interferencias por tioles, tiosulfato, metales pesados y pirofosfato, y que las curvas de calibración varían dependiendo de las condiciones en las que se desarrolle la reacción de detección.

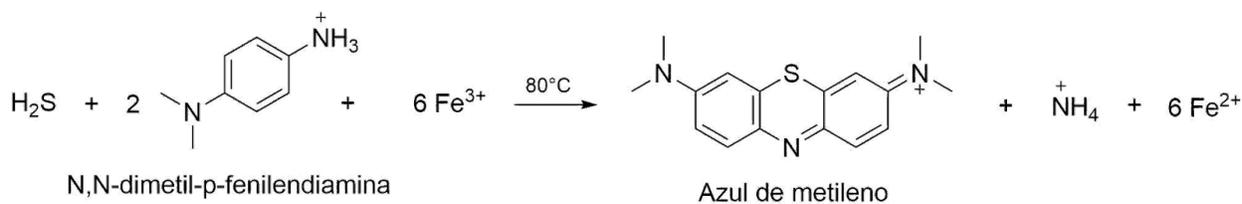
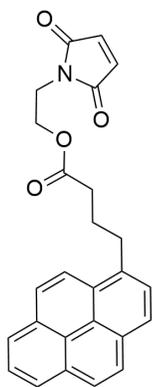


Figura 13: Reacción de formación de azul de metileno. La reacción se da por 20 minutos a 80 °C para luego medir la absorbancia del azul de metileno λ_{max} 670 nm. Imagen adaptada de⁹⁵.

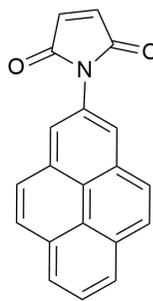
Nueva estrategia para la detección de sulfuro

En este trabajo exploramos la posibilidad de detectar sulfuro mediante la emisión de fluorescencia de excímeros. Esta palabra hace referencia a “dímero excitado”, refiere a la formación de dímeros transitorios de una molécula en su estado excitado con otra en el estado basal, para dar una nueva especie excitada con propiedades espectroscópicas diferentes. La emisión de los excímeros suele darse a longitudes de onda mayores¹⁰⁸. La formación de dichos excímeros depende del encuentro de moléculas en su estado excitado, por lo que es dependiente de la vida media del fluoróforo y de su concentración. La formación de excímeros es promovida por la proximidad de los fluoróforos, y esto ha llevado a las distintas aplicaciones en biofísica. Por ejemplo, se han utilizado derivados lipídicos de pireno para estudiar la difusión lateral de distintos fosfolípidos en membranas, a través de la formación de excímeros de pireno, dependiente de la proximidad de dichos derivados¹⁰⁹. También se han utilizado excímeros de pirenos para el estudio de estructura terciaria de proteínas¹¹⁰, en este caso se utilizan fluoróforos de pireno unidos a un grupo maleimida, el cual actúa como un desactivador de la fluorescencia intramolecular, resultando en una molécula con bajo rendimiento cuántico. La maleimida es blanco del ataque nucleofílico por tioles proteicos, generando cisteínas modificadas con un grupo pireno, con un rendimiento cuántico mucho mayor. De esta manera, si existe proximidad suficiente entre dos cisteínas dentro de la estructura tridimensional de la proteína, podrá ocurrir la emisión de excímeros de pireno.

Considerando esto, se plantea la posibilidad de la utilización de excímeros de pireno para la detección de sulfuro de hidrógeno. La hipótesis de este trabajo es que la doble reactividad del sulfuro permite su reacción con dos moléculas de una sonda pirenílica unida a un grupo maleimida electrófilo. La formación de excímeros tras la excitación será promovida por la proximidad de los grupos pirenílicos en el dímero covalente. Esto permitiría la detección de sulfuro incluso en presencia de tioles, porque la emisión de fluorescencia ocurriría a diferentes longitudes de onda. Se utilizaron dos sondas con estas características, N-(1-pirenil)maleimida (NPM) y 2-maleimidoetil-4-pirenilbutanoato (MEPB) (figura 14).



2-maleimidoetil-4-pirenilbutanoato
(MEPB)



N-(1-pirenil)maleimida
(NPM)

Figura 14 : Estructuras moleculares de las sondas utilizadas en este trabajo:
2-maleimidoetil-4-pirenilbutanoato (MEPB) y N-(1-pirenil)maleimida (NPM).

3.Objetivos

Objetivo general

Estudiar la detección de sulfuro de hidrógeno por formación de excímeros de pireno, a través de la reacción con dos sondas, 2-maleimidoetil-4-pirenilbutanoato y N-(1-pirenil)maleimida. Puesta a punto de un método de detección de sulfuro de hidrógeno por formación de excímeros de pireno.

Objetivos específicos

- Estudiar la formación de excímeros de pireno por la doble reacción del sulfuro de hidrógeno con las dos posibles sondas. Caracterizar los productos de reacción.
- Estudiar la cinética de la reacción del sulfuro de hidrógeno.
- Estudiar la interferencia de distintas moléculas en la reacción del sulfuro de hidrógeno en el método.
- Evaluar la linealidad en la respuesta fluorimétrica de los productos de reacción.
- Aplicar el método desarrollado en la medida de sulfuro de hidrógeno en el estudio de un sistema bioquímico de relevancia.

4. Materiales y métodos

Preparación de soluciones

Los reactivos químicos utilizados fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (San Luis, Missouri, EEUU), Applichem (Darmstadt, Alemania) y GE Healthcare Life Sciences (Little Chalfont, Reino Unido), con excepción de la molécula 2-maleimidoetil-4-pirenilbutanoato, la cual fue cedida por el Dr. John B. Matson de Virginia Tech (Blacksburg, Virginia, EEUU).

Las soluciones stock de sulfuro se prepararon disolviendo $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada y viales sellados, inmediatamente antes de ser utilizadas. A partir de ellas se realizaron las correspondientes diluciones para alcanzar la concentración deseada. Previo a ser masados, los cristales de la sal se lavaron con agua destilada y se secaron para remover impurezas de la superficie, producto de la oxidación con el oxígeno durante su almacenamiento. Para la manipulación de H_2S se utilizaron jeringas Hamilton *gas-tight* y viales sellados con volúmenes tales como para mantener la mínima fase gaseosa en todos los casos.

Se realizaron soluciones stock de N-(1-pirenil)maleimida (NPM) y 2-maleimidoetil-4-pirenilbutanoato (MEPB) en acetonitrilo a partir del reactivo Sigma y del cristal de síntesis, respectivamente, a las cuales se les determinó la concentración espectrofotométricamente por la absorción del grupo pirenilo a 345 nm (épsilon de $40.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)¹¹¹. Ambas soluciones se preservaron a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ y protegidas de la luz. Los reactivos glutatión (GSH), 1,4-ditiotreitol (DTT), cisteína, tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) y ácido ascórbico fueron preparados en el día por masada y disolución directa en agua destilada, y conservadas por el tiempo de utilización en hielo. Las soluciones de tiosulfato de sodio y de acetato de zinc fueron preparadas en agua destilada. Las soluciones de ditionito se prepararon en viales sellados con agua destilada burbujeada con nitrógeno para evitar su degradación por reacción con el oxígeno.

Obtención y tratamiento de glóbulos rojos

La sangre se obtuvo de donantes voluntarios tras la adhesión a un consentimiento informado en la Cátedra y Departamento de Medicina Transfusional, (Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República) y fueron manipulados siguiendo las precauciones de bioseguridad. Antes de ser utilizados en las determinaciones cuantitativas, los glóbulos fueron sometidos a lavados por centrifugación por 5 min a 800 g y resuspensión en PBS repetidas veces hasta obtener un sobrenadante incoloro, luego de lo cual se descartó el sobrenadante y el pellet de glóbulos restante se consideró como 100% de hematocrito.

Estudio de la formación de excímeros por dos posibles sondas

Se hizo reaccionar MEPB o NPM ($200 \text{ } \mu\text{M}$) con GSH, DTT o sulfuro ($50 \text{ } \mu\text{M}$) por 20 min en una mezcla de Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Se realizaron espectros de emisión (λ_{ex} 345

nm) a las diluciones 1/400 de las preparaciones en el mismo solvente, a la misma temperatura, en el fluorímetro Chronos FD (ISS, Champaign, IL, EEUU).

Caracterización de los productos de reacción con MEPB

Caracterización espectroscópica

Espectros UV

Se hizo reaccionar MEPB (25 μM) con GSH (25 μM), sulfuro o DTT (12,5 μM) por 1 hora en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1) a 25 °C. Se realizaron espectros de absorción en el rango 250-380 nm en el espectrofotómetro Varian Cary 50 (Agilent, Santa Clara, EEUU) a dichas reacciones.

Espectros de emisión corregidos

Se midieron espectros de emisión (λ_{ex} 345 nm) a diluciones 1/40 de las mismas reacciones utilizadas para los espectros UV, utilizando polarizadores en posición vertical, con un ancho de rendija de excitación de 1 mm en el fluorímetro.

Espectros de excitación

Se hizo reaccionar MEPB (200 μM) con GSH, sulfuro o DTT (50 μM) por 20 min en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1) a 25 °C. Se midieron espectros de excitación para diluciones 1/400 de las mezclas de reacción con GSH (λ_{em} 380 nm) y con sulfuro y DTT (λ_{em} 480 nm) en el fluorímetro, con un ancho de rendija de 2 mm.

Separación de productos por HPLC

Se hizo reaccionar MEPB (200 μM) con sulfuro (50 μM) por 20 min a 25 °C en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1). Se inyectaron de forma manual 5 μL de una dilución 1/10 de los productos en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1), y se corrieron cromatografías en el equipo Agilent Infinity 1260 que consta de un sistema de bombas cuaternario, detector de absorbancia de arreglo de diodos (1260 DAD VL) y detector de fluorescencia (1260 FDL). Se utilizó una columna de fase reversa C18 Ascentis de 10 cm de largo, 4,6 mm de diámetro interno, con partículas de sílica de 3 micras, y se realizó la corrida a un flujo de 0,8 mL/min. Las fases móviles usadas fueron A: 0,1 % (v/v) ácido trifluoroacético (TFA) en agua milli-Q, y B: acetonitrilo. El método de separación utilizado fue el siguiente: (0 - 0,5') 60% B (4 - 7') 95% B (9 - 13') 60% B. Los productos se analizaron por absorbancia a 345 nm y emisión a 380 y 480 nm (λ_{ex} 345 nm).

Optimización de las condiciones de trabajo

Impacto del solvente en la detección de sulfuro

Efecto de la polaridad del solvente en la formación de excímeros

Se hizo reaccionar MEPB (200 μM) con sulfuro, DTT (50 μM) o GSH (100 μM) en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1) por 20 min a 25 °C. Se realizaron diluciones 1/50 de dichas mezclas de reacción en tres condiciones de solventes: a) Tris (0,1 M, pH 8,5), b) acetonitrilo y c) una mezcla

de Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1). A las diluciones se les registró el espectro de emisión (λ_{ex} 345 nm) en el lector de placas del equipo Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific, Finlandia).

Etanol como solvente alternativo

Para evaluar la sustitución del acetonitrilo por un solvente más seguro y amigable con el ambiente, la reacción de MEPB (200 μM) con sulfuro (50 μM) se realizó en Tris (0,1 M, pH 8,5)/etanol 70% (1:1) a 25 °C. Se inició la reacción con el agregado de sulfuro y se registraron espectros de emisión (λ_{ex} 345 nm) a alícuotas tomadas cada 3 min diluidas 1/400 en el mismo solvente.

Por otro lado, se hizo reaccionar MEPB (200 μM) con sulfuro (50 μM) en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1) por 20 min a 25 °C, y luego se midieron espectros de emisión (λ_{ex} 345 nm) de diluciones 1/400 en Tris (0,1 M, pH 8,5)/etanol 70% (1:1).

Estabilidad de MEPB frente a hidrólisis alcalina

Con el fin de evaluar la estabilidad de la sonda a distintos pHs, se incubó MEPB (10 μM) en borato (0,1 M)/acetonitrilo (1:1) a pHs 9 y 10. Se realizaron espectros de emisión (λ_{ex} 345 nm) en el lector de placas a diluciones 1/40 en los mismos amortiguadores utilizados para las reacciones, de alícuotas tomadas cada 5 min.

Optimización del tiempo de reacción

Cinética exploratoria

Se midió la emisión a 480 nm en el tiempo (λ_{ex} 345 nm) de las mezclas de reacción de MEPB (705 nM) con sulfuro (5-150 μM) en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1) a 25 °C, que se iniciaron con la inyección de pequeños volúmenes de sulfuro en una cubeta de cuarzo tapada con un septo en el fluorímetro. Los datos de los cursos temporales fueron analizados en el programa Dynafit, modelando las reacciones en 2 etapas (detallado más adelante en *Resultados y discusión*), de cuyo ajuste se obtuvieron estimados para las distintas constantes cinéticas.

Cinética de pseudo-primer orden para MEPB

Se hizo reaccionar sulfuro (5 μM) con MEPB en exceso (50-350 μM) en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1) a 25 °C, en una cubeta de cuarzo de 4 mm de paso óptico tapada con un septo. Se midió la emisión a 480 nm en el tiempo (λ_{ex} 345 nm) en el fluorímetro. Se ajustó una ecuación exponencial más recta a los cursos temporales y se obtuvieron valores de constantes cinéticas observadas de primer orden (k_{obs}) para cada concentración de MEPB. A partir de la pendiente de la gráfica de k_{obs} vs concentración de MEPB, se determinó la constante cinética de segundo orden del paso limitante de la reacción.

Estrategia de atrapado del sulfuro como ZnS aplicado a la reacción con MEPB

Se prepararon las mezclas de reacción en tres condiciones: a) solución de sulfuro (10 μM) en la que se inicia la reacción con el agregado de MEPB (200 μM) en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1) directamente, b) pre-incubación del sulfuro (10 μM) con acetato de zinc (50 μM) y se inicia la

reacción con MEPB y c) se pre-incuba el sulfuro con acetato de zinc de la misma manera que en la condición b, pero se inicia la reacción con el agregado de DTPA (0,1, 1 o 2 mM finales) junto con el MEPB. Todos los preparados se incubaron por 30 min a 25 °C. Se mide la emisión a 480 nm (λ_{ex} 345 nm) de diluciones 1/40 de las alícuotas tomadas en el tiempo.

Estudio de la linealidad y el límite de detección

Estudio de la linealidad en el rango micromolar y submicromolar

Se hicieron curvas de calibración para dos rangos haciendo reaccionar sulfuro (5-20 μM y 0,2-1 μM) con MEPB (200 μM) por 20 min a 25 °C en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1). Luego de realizar diluciones 1/40, se midieron espectros de emisión (λ_{ex} 345 nm) de las distintas soluciones en el lector de placas, a partir de los cuales se realizaron curvas de calibración los valores de emisión a 480 nm.

Estudio de la linealidad en la separación por HPLC

Búsqueda del rango de linealidad

Se hizo reaccionar sulfuro (50 μM) con MEPB (200 μM) en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1) por 20 min a 25 °C y se prepararon diluciones de concentraciones correspondientes a 5×10^{-7} , 5×10^{-8} , 5×10^{-9} y 5×10^{-10} M respecto a la concentración del sulfuro original. Se inyectaron 5 μL de las diluciones en el HPLC, y se sometieron a corridas cromatográficas con el método nombrado previamente. Los productos se analizaron por absorbancia a 345 nm y emisión a 380 y 480 nm (λ_{ex} 345 nm). Se calculó el área bajo la curva de los picos de emisión a 480 nm que se graficaron en función de las concentraciones finales de sulfuro para obtener la curva de calibración.

Estudio de la linealidad en el rango nanomolar

Se inyectaron en el HPLC alícuotas de 25 μL de diluciones en el rango nanomolar bajo (1-10 nM) de los productos de reacción, obtenidas a partir de la incubación de sulfuro (50 μM) con MEPB (200 μM) en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1) por 20 min a 25 °C, y se corrieron con el método nombrado previamente. Los productos se analizaron por absorbancia a 345 nm y emisión a 380 y 480 nm (λ_{ex} 345 nm). Por otro lado, se prepararon soluciones con el mismo nivel de concentración, pero a partir de la reacción directa de diluciones de sulfuro (1-10 nM) con MEPB (200 μM). Se inyectaron 25 μL de estas soluciones sin diluir para realizar corridas con el mismo método y se analizaron los productos por absorbancia a 345 nm y emisión a 380 y 480 nm (λ_{ex} 345 nm).

Linealidad de la respuesta en el método Zn^{2+} -DTPA

Se incubó sulfuro en concentraciones de 1 a 8 μM finales con acetato de zinc (60 μM) en Tris (0,1 M, pH 8,5) por 5 min, se inició la reacción con el agregado de DTPA (2 mM) y MEPB en acetonitrilo (200 μM) tal que la reacción ocurrió en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1) por 30 min a 25 °C. Se midió la emisión a 480 nm (λ_{ex} 345 nm) de diluciones 1/40 de las mezclas de reacción en el lector de placas.

Curva de calibración a partir de la fase gaseosa

Se utilizó un sistema descrito anteriormente⁹³, que consiste en una fase acuosa y una gaseosa de volumen conocido, en el que se deja equilibrar el sulfuro para luego sacar alícuotas de la fase gaseosa.

Una jeringa de 25 mL de polipropileno es sellada con un émbolo y un septo (figura 15 A), y se mantiene en agitación, con 500 μL de fase acuosa y 20 mL de fase gaseosa. El volumen de fase gaseosa disponible se calculó a partir de la masa de agua destilada que es capaz de contener la jeringa, teniendo en cuenta la densidad de agua a la temperatura de trabajo para la realización de los cálculos.

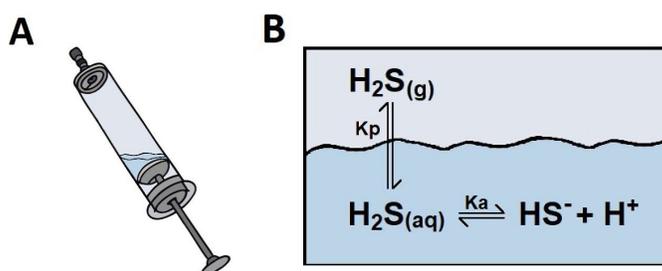


Figura 15: Esquema del sistema de medidas de sulfuro en la fase gaseosa y de los equilibrios involucrados. A) Las reacciones se llevaron a cabo en una jeringa sellada herméticamente con 20 mL de fase gaseosa y 500 μL de fase acuosa. La punta de la jeringa se encuentra tapada con un septo de goma y un émbolo permite regular el volumen de la fase gaseosa. Las alícuotas de la fase gaseosa se extraen con una jeringa Hamilton *gas-tight*. El sistema se mantuvo en agitación a 25 °C. B) Esquema representativo de los equilibrios involucrados. El sulfuro en la fase acuosa se encuentra tanto en forma de H_2S como de HS^- ; sus concentraciones determinadas por el pK_a y el pH de la solución. La forma protonada ($\text{H}_2\text{S}(\text{aq})$) se encuentra en equilibrio con la especie gaseosa ($\text{H}_2\text{S}(\text{g})$), cuyas proporciones están dadas por el coeficiente de partición K_p .

En el sistema descrito en la figura 15 se pueden plantear dos equilibrios:



Con sus correspondientes constantes K_p y K_a dadas por:

$$K_p = \frac{[\text{H}_2\text{S}]_{(\text{g})}}{[\text{H}_2\text{S}]_{(\text{aq})}} \quad (\text{Ec. 15})$$

$$K_a = \frac{[\text{HS}^-] + [\text{H}^+]}{[\text{H}_2\text{S}]_{(\text{aq})}} \quad (\text{Ec. 16})$$

K_p se conoce como la constante de Henry (H), y se suele encontrar en la literatura definida como:

$$H = \frac{n}{p} \quad (\text{Ec. 17})$$

Donde n es igual a la concentración de sulfuro en la fase acuosa, con unidades de $\frac{\text{moles H}_2\text{S}}{\text{moles agua}}$ y p es la presión parcial de sulfuro en la fase gaseosa, expresada en unidades de (atm), por lo que

la constante de Henry para el sulfuro, tiene unidades de $\left(\frac{\text{moles } H_2S}{\text{moles agua} \cdot \text{atm}}\right)$. Como conocemos la concentración de agua en una solución acuosa, $55,5 \left(\frac{\text{mol}}{L}\right)$, podemos multiplicar por este valor a n para obtener una expresión con unidades de (M) :

$$n \left(\frac{\text{moles } H_2S}{\text{moles agua}}\right) \times 55,5 \left(\frac{\text{moles agua}}{L}\right) = [H_2S]_{(aq)} (M) \quad (Ec. 18)$$

Donde $[H_2S]_{(aq)}$ se corresponde a la concentración de sulfuro en la fase acuosa, en unidades de (M) . Sustituyendo este término en la Ec. 17, obtenemos:

$$H \times p \times 55,5 = [H_2S]_{(aq)} \quad (Ec. 19)$$

Según la ecuación de los gases ideales:

$$p \cdot V = nRT \quad (Ec. 20)$$

$$p = \frac{nRT}{V} \quad (Ec. 21)$$

Podemos obtener una expresión de la presión parcial de sulfuro en la fase gaseosa:

$$\frac{n}{v} = [H_2S]_{(g)} \quad (Ec. 22)$$

$$p = [H_2S]_{(g)} RT \quad (Ec. 23)$$

De manera de sustituir la presión parcial de sulfuro en la fase gaseosa en la Ec. 19:

$$H \times [H_2S]_{(g)} RT \times 55,5 = [H_2S]_{(aq)} \quad (Ec. 24)$$

Y obtenemos una expresión de la constante de Henry en la cual las concentraciones se encuentran expresadas con unidades de (M) el cual se corresponde con Kp .

$$Kp = \frac{[H_2S]_{(g)}}{[H_2S]_{(aq)}} = \frac{1}{H R T 55,5} \quad (Ec. 25)$$

Conociendo el valor de $H = 15,7 \times 10^{-4} \left(\frac{\text{moles } H_2S}{\text{moles agua} \times \text{atm}}\right)^{112}$, la constante de los gases ideales $R = 0.082057 \left(\frac{\text{atm} \cdot L}{\text{mol} \cdot K}\right)$ y la temperatura en Kelvin $T = 298 (K)$ obtenemos la constante adimensional de Henry para sulfuro:

$$Kp = 0.4 = \frac{[H_2S]_{(g)}}{[H_2S]_{(aq)}} \quad (Ec. 26)$$

Este valor coincide con valores obtenidos experimentalmente $(0,4 \pm 0,1)^{17}$.

Por conveniencia, definimos una constante que considere ambas especies en solución, que denominaremos Kp' :

$$Kp' = \frac{[H_2S]_{(g)}}{[H_2S]_{(aq)} + [HS^-]} \quad (Ec. 27)$$

Que podemos obtener corrigiendo la constante adimensional de Henry Kp con el pK_a de la siguiente manera:

$$Kp' = Kp \cdot \frac{10^{-pH}}{10^{-pH} + 10^{-pKa}} = 0,13 \quad (Ec. 28)$$

Para el sistema esquematizado en la figura 13, el balance de masas para el sulfuro estará dada por la ecuación:

$$\text{moles sulfuro} = V_{aq} \times M_{aq} + V_g \times M_g \quad (Ec. 29)$$

Donde V_{aq} es el volumen de la fase acuosa y V_g el volumen de la fase gaseosa. Integrando esta ecuación con el coeficiente de Henry:

$$\text{moles sulfuro} = V_{aq} \times M_{aq} + V_g \times M_{aq} \times Kp' \quad (Ec. 30)$$

Para el sistema utilizado, en el cual conocemos los volúmenes de la fase acuosa y de la fase gaseosa, y el valor de constante adimensional de Henry, sustituimos:

$$\text{moles sulfuro} = 500 \mu\text{L} \times M_{aq} + 20 \text{ mL} \times M_{aq} \times 0,1338 \quad (Ec. 31)$$

Obtenemos una expresión que nos permite determinar las concentraciones de sulfuro en ambas fases en el equilibrio, al conocer la cantidad de moles inyectados en el sistema.

Para obtener una curva de calibración, se inyectaron 0,3 micromoles de sulfuro en los 500 μL de PBS del sistema en agitación. Luego de 20 min de espera en agitación para equilibrar, se espera obtener una concentración en la fase gaseosa de 12,6 μM . Se tomaron volúmenes de 250 a 20 μL de la fase gaseosa y se burbujearon en soluciones de Zn^{2+} (125 μL , 60 μM) en Tris (0,1 M, pH 8,5) en viales sellados. Para iniciar las reacciones se inyectó MEPB (200 μM) junto con DTPA (2 mM) en los viales con ZnS (250 μL , volumen final, Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1)). Se dejó reaccionar por 30 min a 25 °C y luego se midió la emisión a 480 nm (λ_{ex} 345 nm) de diluciones 1/40 de dichas mezclas de reacción. Se graficó la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de sulfuro que reacciona con Zn^{2+} en el vial en un volumen de 125 μL , a partir de la concentración esperada en la fase gaseosa y el volumen de gas inyectado en dicho vial.

Respuesta del método frente a posibles interferentes

Interferencia por nucleófilos de interés bioquímico

Se hizo reaccionar Cys, tiosulfato de sodio y TCEP (50 μM) con MEPB (200 μM) en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1) por 20 min a 25 °C. Luego se le realizaron espectros de emisión (λ_{ex} 345 nm) a diluciones 1/40 de las soluciones en el lector de placas.

Interferencia por tioles

Se hizo reaccionar MEPB (200 μM) con sulfuro (5 μM) en presencia de 0,5, 5 y 50 μM de GSH en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1) por 20 min a 25 °C. Luego se le midieron espectros de emisión (λ_{ex} 345 nm) a diluciones 1/40 en el lector de placas.

Se preparó una curva de calibración con MEPB (200 μM) y sulfuro (2-11 μM) en presencia de 50 μM GSH en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1) por 20 min a 25 °C. Luego se midieron espectros de emisión (λ_{ex} 345 nm) de diluciones 1/40 en el lector de placas.

Cinética de consumo de sulfuro por glóbulos rojos

Medidas con alícuotas tomadas de la fase acuosa

Se utilizaron 7 viales con insertos de 250 μL con glóbulos rojos (250 μL , 10% de hematocrito) en PBS con perlas de vidrio para facilitar el homogeneizado. Se iniciaron las reacciones con la inyección de pequeños volúmenes de sulfuro (100 μM) y se incubaron por distintos tiempos. Las reacciones se detuvieron por la centrifugación a 135 g por 30 s, la toma de 20 μL de sobrenadante y la inyección en 100 μL de Zn^{2+} (50 μM) en Tris (0,1 M, pH 8,5), que se encontraban en otro vial sellado. Luego de completado el muestreo de todos los tiempos de reacción planificados, se agregó a los viales con Zn^{2+} y la muestra, MEPB (200 μM) y DTPA (2 mM), y se incubaron por 30 min a 25 °C (en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1), volumen final 250 μL). Se midió la emisión a 480 nm (λ_{ex} 345 nm) de diluciones 1/40 de dichas soluciones.

En paralelo a los experimentos, se realizó una curva de calibración de sulfuro. Para esto se inyectaron 20 μL de diluciones de concentración conocida de sulfuro (10-100 μM) en viales con 100 μL de Zn^{2+} (50 μM) en Tris (0,1 M, pH 8,5), los cuales fueron incubados por 30 min con MEPB (200 μM) y DTPA (2 mM) a 25 °C (en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1), volumen final 250 μL).

Se realizó un control de reactividad del sobrenadante. Por un lado, se incubaron 20 μL de una solución de sulfuro (100 μM) con 80 μL Zn^{2+} (50 μM) con el agregado de 20 μL de sobrenadante (centrifugación de una suspensión de glóbulos rojos de 10% de hematocrito a 135 g por 30 s). Por otro lado, se hizo el mismo preparado, pero sustituyendo el sobrenadante por 20 μL de PBS. A las mezclas se les agregó MEPB (200 μM) y DTPA (2 mM) y se incubó en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1) por 30 min a 25 °C. Se midió la emisión a 480 nm (λ_{ex} 345 nm) de diluciones 1/40 de todos los preparados.

Prueba de reductores

Se evaluó la posibilidad de reducir los interferentes extracelulares con ácido ascórbico y ditionito de sodio. Se inyectaron 20 μL de una solución de sulfuro de concentración 100 μM a 60 μL Zn^{2+} (50 μM) y 20 μL de sobrenadante de los glóbulos rojos. Un control sin reductores llevó 25 μL de PBS adicionales, mientras que se agregó 25 μL de ácido ascórbico (1 mM) a 3 viales o ditionito de sodio (1 mM) a otros tres. Se preparó también un control sin sobrenadante, que fue sustituido por PBS. Luego se agregó MEPB (200 μM) y DTPA (2 mM) a todos los preparados y se incubó por 30 min a 25 °C (Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1) final). Se midió la emisión a 480 nm (λ_{ex} 345 nm) de una dilución 1/40 de dichos controles.

Medidas con alícuotas tomadas de la fase gaseosa

Control cinético de equilibrio de fases

Para validar las medidas cinéticas de consumo de sulfuro en la solución acuosa a partir de muestras tomadas en la fase gaseosa, se estudió el tiempo de equilibramiento de fases de dicho compuesto en el sistema. Se realizaron medidas en el tiempo de la concentración de sulfuro en la fase gaseosa luego de inyectar una cantidad conocida en la fase acuosa. Se utilizó el mismo sistema descrito anteriormente de una jeringa de 25 mL de polipropileno sellada con un émbolo que se mantuvo en agitación, con 500 μL de fase acuosa y 20 mL de fase gaseosa.

Se inyectaron 0,2 micromoles de sulfuro en los 500 μL de PBS del sistema en agitación y se espera 8,4 μM en la fase gaseosa en el equilibrio. Se tomaron 200 μL de la fase gaseosa a distintos tiempos y se burbujearon en viales sellados con una solución de Zn^{2+} (60 μM , 125 μL) en Tris (0,1 M, pH 8,5). Se inyectó MEPB en acetonitrilo (200 μM) junto con DTPA (2 mM), tal de obtener un volumen final de 250 μL , para iniciar las reacciones con el sulfuro, se incubó en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1) por 30 min a 25 °C, luego de los cuales se midieron los espectros de emisión (λ_{ex} 345 nm) a diluciones 1/40.

5.Resultados

Estudio de la formación de excímeros por dos posibles sondas.

Los pirenos son fluoróforos con buen rendimiento cuántico que han tenido una variedad de aplicaciones. La forma derivatizada con butirato en la posición 1 es de uso frecuente para el acoplado a otros motivos moleculares. La formación de un éster con la maleimida (NPM y MEPB) produce moléculas que emiten con muy baja eficiencia. La reacción de tioles, por ejemplo, con la maleimida restaura el rendimiento cuántico del pireno.

Según el planteo metodológico, la formación de dímeros de sonda conectados covalentemente promovería la emisión de excímeros. La capacidad del sulfuro de ser un “doble nucleófilo” permitiría anclar dos pirenos y generar un producto de emisión característica. Para estudiar la capacidad de formación de excímeros por parte de las dos posibles sondas MEPB y NPM, se midieron espectros de los productos de reacción de ambas moléculas con DTT, GSH y sulfuro.

El DTT se utilizó como control positivo ya que, al tener dos grupos tiol unidos por una cadena de 4 carbonos, no sólo se daría la reacción con la maleimida de una molécula de sonda y cese del quencheo, sino que también el producto primario podría reaccionar con una segunda molécula de sonda para dar un derivado dialquilo, que favorecería por cercanía el apilamiento de los grupos pirenos y la formación de excímeros. El GSH cumpliría el rol de control negativo, ya que su grupo tiol podría reaccionar con el grupo maleimida, para dar un derivado monoalquilo que al ser sometido a luz daría el correspondiente monómero excitado, pero al no tener otro grupo nucleófilo, sería incapaz de la doble reacción y no favorecería la formación de excímeros. El sulfuro podría reaccionar con dos grupos maleimida y formar el derivado dialquilo. En principio, fue necesaria la verificación experimental para saber si, pese a su menor tamaño con respecto al DTT, permitiría la flexibilidad necesaria para el apilamiento de los grupos pirenos en dicho derivado, para inducir la formación de excímeros.

Las incubaciones de NPM con GSH mostraron dos picos de emisión a 380 y 400 nm, característicos de la emisión del grupo pirenilo¹⁰⁸, estos picos son adjudicables a la emisión del correspondiente monómero excitado (Figura 16). Los espectros para los productos de reacción con DTT presentaron una forma distinta, con picos a 380 y 400 nm disminuidos, y un nuevo pico con máximo a 480 nm que, dada la posibilidad de doble reactividad del DTT, es posible que se corresponda a la emisión de excímeros de NPM con DTT. Los excímeros emiten a longitudes de onda mayores que sus correspondientes monómeros y en este caso se observa un corrimiento de Stokes mayor en 80-100 nm. La presencia de los picos característicos del monómero excitado podría indicar que la eficiencia no es total en la reacción con una segunda molécula de NPM y/o que la dinámica de formación de excímeros en el derivado dialquilo no es completamente efectiva.

Los espectros de la reacción con sulfuro mostraron solamente picos a 380 y 400 nm, similares a los de la reacción con GSH (Figura 16). La ausencia de pico a 480 nm se interpreta como una imposibilidad de formación de excímeros. En las figuras 17, 18 y 19 se representan

esquemáticamente las reacciones de NPM con las tres moléculas. Dada la doble reactividad del sulfuro, se asume que sí se da la formación del derivado dialquilo, pero que, posiblemente, la menor flexibilidad de éste con respecto al derivado dialquilo de la doble reacción con DTT, no permite el apilamiento necesario entre los grupos pirenilo para la formación de excímeros. Por ello, se planteó la necesidad de contar con una sonda de pireno unido al grupo maleimida a través de una cadena más larga y flexible. Gracias a una interacción con John Matson, de Virginia Tech, pudimos contar con esta molécula, la MEPB.

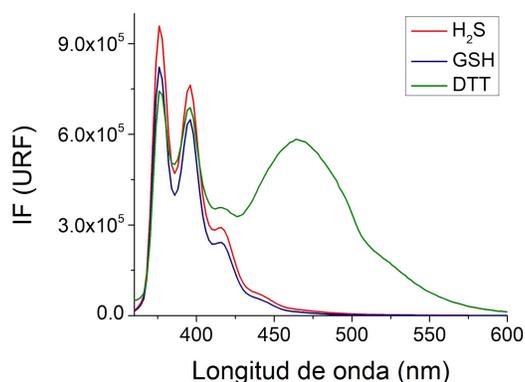


Figura 16: Emisión de los productos de reacción con NPM. Espectro de emisión (λ_{ex} 345 nm) de los productos de reacción de NPM (200 μ M) con sulfuro, GSH o DTT (50 μ M) por 20 min a 25 °C en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1) y diluidas 1/400 en el mismo solvente.

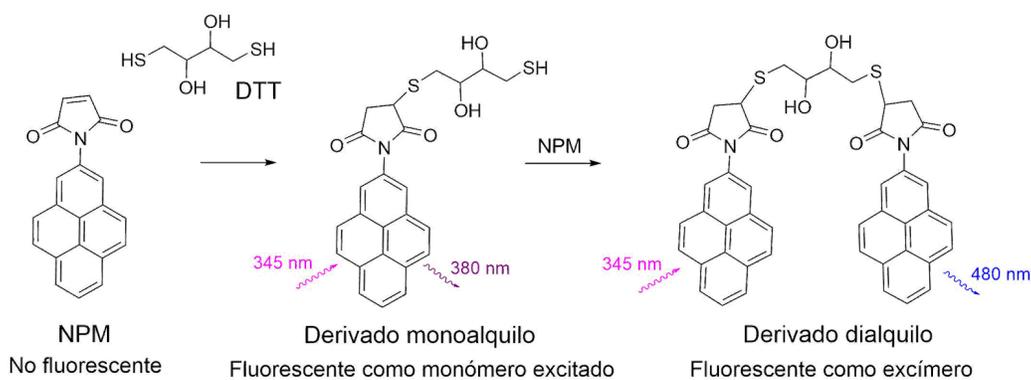


Figura 17: Esquema de la reacción de NPM con DTT y representación del comportamiento como fluoróforo de los productos. NPM puede reaccionar con una molécula de DTT para dar el correspondiente derivado monoalquilo, en el cual se restaura la fluorescencia, este primer producto es capaz de reaccionar con una segunda molécula de NPM para dar el correspondiente derivado dialquilo, el cual es capaz de emitir como excímero.



Figura 18: Esquema de la reacción de NPM con GSH y representación del comportamiento como fluoróforo de los productos. NPM puede reaccionar con una molécula de GSH para dar el correspondiente derivado monoalquilo fluorescente como monómero excitado, la reacción con una segunda molécula de NPM no es posible.

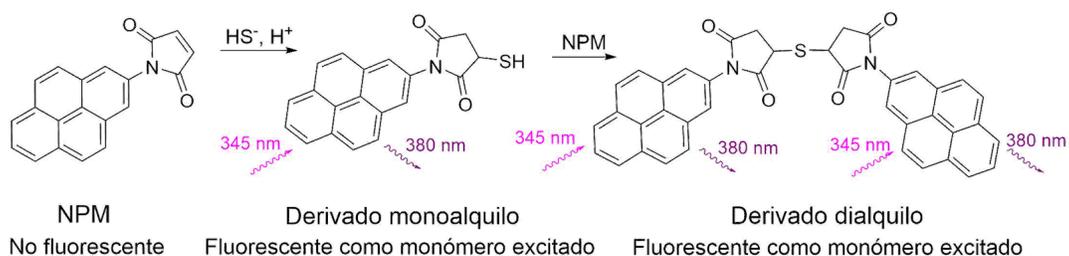


Figura 19: Esquema de la reacción de NPM con sulfuro y representación del comportamiento como fluoróforo de los productos. NPM puede reaccionar con una molécula de sulfuro para dar el correspondiente derivado monoalquilo, en el cual se restaura la fluorescencia característica del grupo pirenilo, este primer producto es capaz de reaccionar con una segunda molécula de NPM para dar el correspondiente derivado dialquilo, pero este derivado no es capaz de emitir como excímero, sino que lo hace como monómero excitado.

Al estudiar la sonda MEPB, se observó que el espectro de los productos de su reacción con GSH presenta dos picos similares a los observados con NPM, dos máximos a 380 y 400 nm correspondientes a la emisión del monómero excitado del producto de la reacción entre MEPB y GSH (Figura 20). La reacción con DTT generó un espectro con un pico marcado a 480 nm y dos picos de baja intensidad a 380 y 400 nm, lo que se interpreta como formación de excímeros. La mayor intensidad del pico a 480 nm con respecto a los de longitudes de onda menores refleja un mejor rendimiento en la formación de excímeros de DTT con MEPB, en comparación al producto de DTT con NPM.

En este caso, el espectro de los productos de la reacción de MEPB con sulfuro mostró una forma muy similar al de la reacción con DTT: el pico a 480 nm indica la formación de excímeros (Figura 20). Los picos a 380 nm y 400 nm presentan una mayor intensidad que los del espectro de MEPB solo, lo que indica la emisión de monómeros excitados de MEPB con sulfuro o una dinámica de formación de excímeros que no es completamente efectiva. Por otro lado, la baja intensidad de los picos a 380 y 400 nm con respecto al pico a 480 nm implica que la reacción con una segunda molécula de MEPB y formación de excímeros se da con un alto rendimiento. En este caso, ya que la molécula de MEPB presenta una cadena carbonada de mayor tamaño entre el grupo maleimida y el grupo pirenilo que la molécula de NPM, en el derivado dialquilo de

sulfuro y MEPB se permite la flexibilidad necesaria para la formación de excímeros, que no se daba con NPM.

El compuesto MEPB solo prácticamente no produce emisión, salvo por un pequeño pico con máximo cercano a 390 nm. Esto se puede deber a trazas del producto de la rotura del enlace éster que conduciría al cese del quencheo del grupo pirenilo, probablemente por fotólisis o hidrólisis. En la figura 24 se esquematiza dicha reacción, que da lugar a la formación del producto 4-(1-pirenil)butírico, que sería capaz de emitir característicamente como un derivado de pireno.

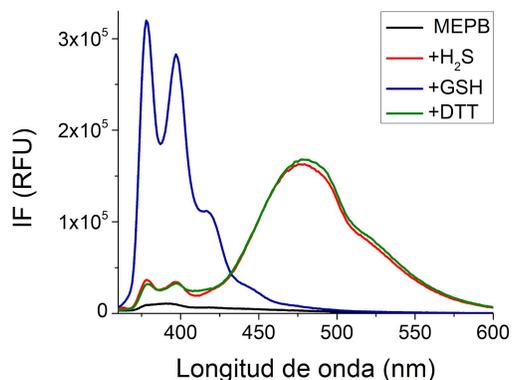


Figura 20: Emisión de los productos de reacción con MEPB. Espectro de emisión (λ_{ex} 345 nm) de una solución de MEPB (200 μ M) en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1) y en reacción con sulfuro, GSH o DTT (50 μ M) por 20 min a 25 °C y luego diluido 1/400 en el mismo solvente.

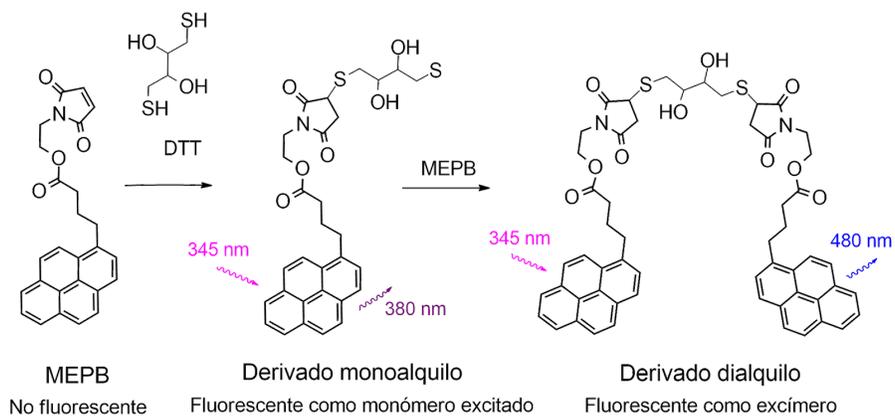


Figura 21: Esquema de la reacción de dos moléculas de MEPB con una de DTT y representación del comportamiento como fluoróforos de los productos. El DTT puede reaccionar con MEPB. En una segunda etapa, este derivado puede volver a alquilarse. A los productos moleculares de la primera y segunda reacción se los denomina derivados monoalquilo y dialquilo, respectivamente. Los derivados monoalquilo sólo pueden emitir como monómeros excitados, mientras que la excitación de los dímeros induce la formación de excímeros.

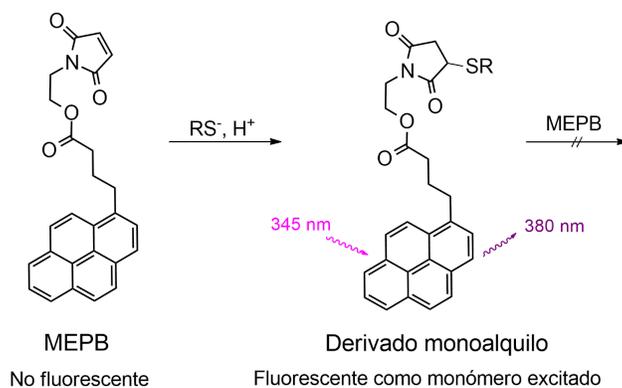


Figura 22: Esquema de la reacción de MEPB con un un tiol genérico y representación del comportamiento como fluoróforo del producto. Los tioles pueden reaccionar sólo una vez como nucleófilos, estas reacciones sólo pueden generar productos monoalquilo. Los derivados monoalquilo pueden emitir como monómeros excitados.

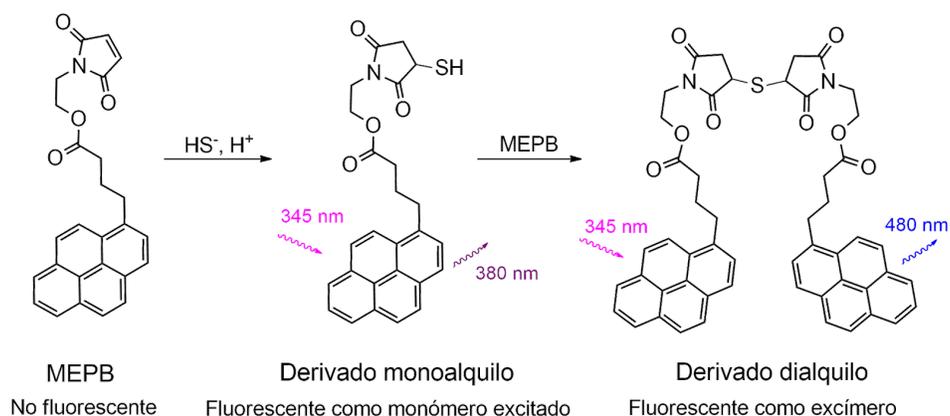


Figura 23: Esquema de la reacción de dos moléculas de MEPB con una de sulfuro y representación del comportamiento como fluoróforos de los productos. El sulfuro puede ser alquilado para generar un tiol intermediario. En una segunda etapa, este derivado puede volver a alquilarse. A los productos moleculares de la primera y segunda reacción se los denomina derivados monoalquilo y dialquilo, respectivamente. Los derivados monoalquilo sólo pueden emitir como monómeros excitados, mientras que la excitación de los dímeros induce la formación de excímeros (complejos diméricos transitorios por la interacción de un pireno excitado con un pireno cercano). La diferenciación entre un monómero excitado y un excímero se evidencia por la emisión a diferentes longitudes de onda.

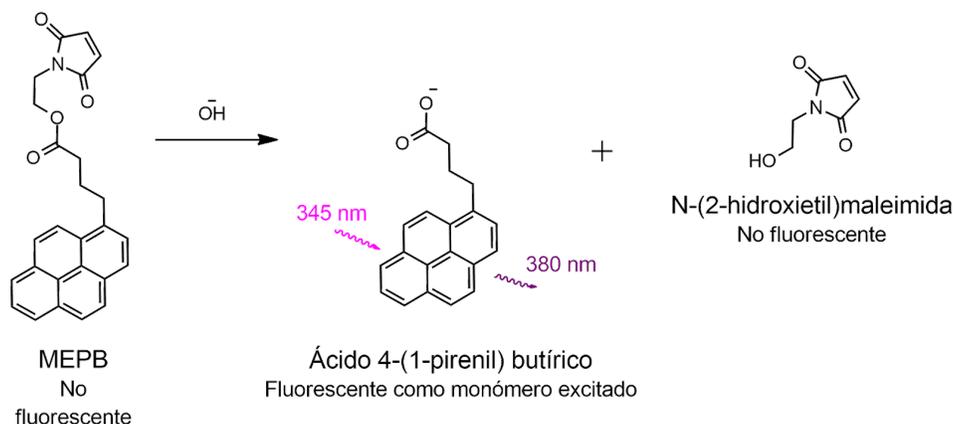


Figura 24: Reacción de hidrólisis del enlace éster de la molécula MEPB y representación del comportamiento como fluoróforo de uno de sus productos. En solución acuosa, el enlace éster de la molécula MEPB (no fluorescente) puede hidrolizarse para dar N-(2-hidroxiethyl)maleimida (no fluorescente) y 4-(1-pirenil)butírico (fluorescente como monómero excitado).

Estos resultados indican la posibilidad de formación de excímeros de pireno de la sonda MEPB en reacción con sulfuro, y su detección fluorimétrica y diferenciación con respecto al producto generado por un tiol modelo, el GSH. En base a estos resultados es que se procede a caracterizar en mayor profundidad los productos de reacción de la sonda MEPB con sulfuro y los distintos controles.

Caracterización de los productos de reacción con MEPB

Caracterización espectroscópica

Espectros de absorción

Los espectros UV de las distintas reacciones se muestran muy similares, con cuatro picos de absorción en las longitudes de onda 265, 276, 327 y 342 nm (Figura 25), característicos del grupo pirenilo.

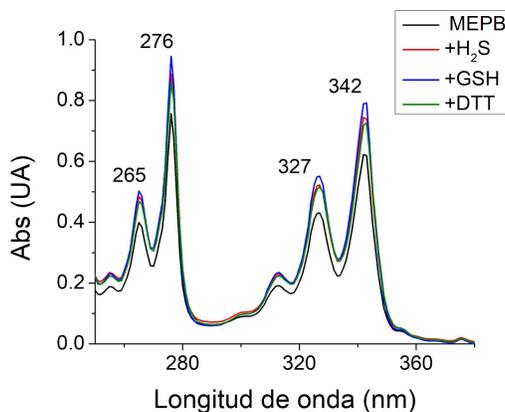


Figura 25. Espectro de absorbancia de los productos de reacción con MEPB. Espectro UV de una solución de MEPB (25 μ M) y en reacción con GSH (25 μ M), sulfuro o DTT (12,5 μ M) por 20 min a 25 $^{\circ}$ C en (Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1)).

Espectros de emisión corregidos

De manera de independizar los espectros de emisión del equipo utilizado, es de interés realizar espectros corregidos para la anomalía de Wood, fenómeno característico de la metodología de monocromación de la luz, mediante utilización de rejillas de difracción¹⁰⁸. En algunas longitudes de onda existe una caída en la intensidad del componente de la luz monocroma que se encuentra polarizado en el sentido perpendicular a las rejillas de difracción. Para evitar este artefacto simplemente se utiliza un polarizador de luz, de manera de polarizar los rayos incidentes en el mismo sentido que se encuentran las rejillas de difracción, antes de que las atraviesen.

Los espectros de emisión corregidos para la anomalía de Wood son muy similares a los espectros no corregidos, pero con un pico a 480 nm más limpio (Figura 26), sin la leve caída presente en los no corregidos (Figura 20) a 510 nm aproximadamente.

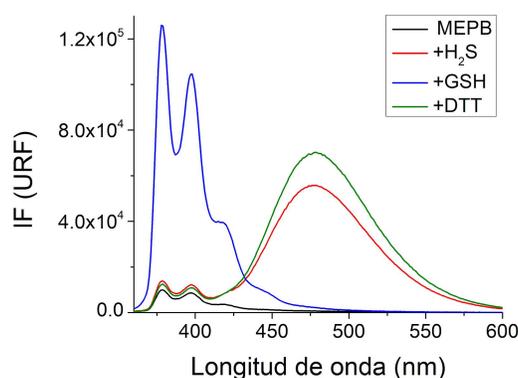


Figura 26. Espectros de emisión de los productos de reacción con MEPB con corrección de la anomalía de Wood. Espectro de emisión (λ_{ex} 345 nm) de una solución de MEPB (25 μM) y en reacción con GSH (25 μM), sulfuro o DTT (12,5 μM) en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1) por 20 min a 25 °C, y luego diluidos 1/40 en el mismo solvente. Estos espectros se midieron incluyendo polarizadores de excitación y emisión en posición vertical.

Espectros de excitación

Los espectros de excitación son muy similares a los de absorción (Figura 27), con un pico mayor con máximo a 342 nm y dos hombros a 276 y 327 nm. Los espectros de las tres reacciones muestran una forma idéntica, en concordancia con lo esperado, ya que la emisión se da en los cuatro casos por la excitación del grupo pirenilo. La solución de MEPB exhibe una emisión muy baja ya que dicha molécula se encuentra quencheada por el grupo maleimida. El pequeño pico probablemente se deba a la emisión del producto de hidrólisis o fotólisis del enlace éster entre la maleimida y el pireno. A partir del pico de mayor intensidad es que se determina la λ_{ex} a utilizar para detectar los productos de la reacción.

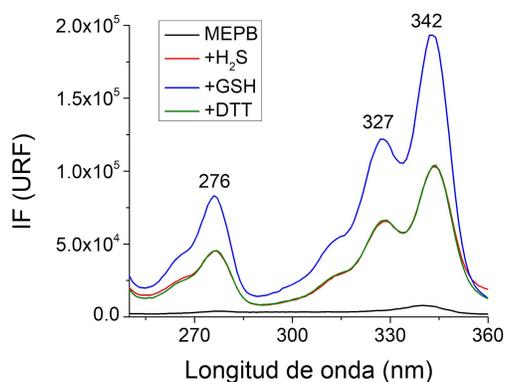


Figura 27. Espectros de excitación de los productos de reacción con MEPB. Espectros de excitación para una solución de MEPB (25 μM) y en reacción con GSH (25 μM , λ_{em} 380 nm), con sulfuro o DTT (12,5 μM , λ_{em} 480 nm). Todas las reacciones se desarrollaron por 20 min a 25 $^{\circ}\text{C}$ y son luego diluidas 1/400 en el mismo solvente (Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1)).

Separación de los productos por HPLC

La cromatografía de fase reversa resultó ser efectiva para lograr la separación de los productos de la reacción. A partir de los registros de absorbancia a 345 nm de la figura 28 podemos identificar los distintos picos de moléculas que contienen el grupo pirenilo. El pico de mayor área, con tiempo de retención de 6.9 min, se correspondería con la molécula de MEPB íntegra, ya que al mismo tiempo de elución no se aprecia emisión a 380 ni a 480 nm, en concordancia a que el grupo pirenilo se encuentra quencheado. El pico de mayor tiempo de retención, 9,3 min, es decir, el más afín a la fase estacionaria apolar y por lo tanto la molécula más hidrofóbica, se correspondería al derivado dialquilo de MEPB con sulfuro. Esto es consistente con la observación de excímeros, ya que a este tiempo se aprecia emisión a 480 nm, exclusiva de esta especie. El tercer pico significativo con absorbancia a 345 nm con tiempo de retención de 4,4 min, que también es capaz de emitir a 380 nm, podría estar dado por el producto de hidrólisis o fotólisis del enlace éster de la molécula de MEPB, 4-(1-pirenil)butírico cargado y no quencheado.

Estos resultados aportan evidencia que confirma la formación de excímeros del producto dialquilo de la doble reacción de sulfuro con MEPB. Por un lado, al determinar que la emisión proviene del grupo pirenilo y que ocurre con un corrimiento de Stokes de 100 nm con respecto a la emisión del producto con GSH, y, por otro lado, al observar una menor polaridad de la especie con emisión característica de excímeros con respecto al resto de las especies. También se aprecia una diferenciación espectroscópica con respecto al producto generado por el tiol modelo, GSH. Visto esto, se procede a optimizar las condiciones de reacción para generar un método de detección de sulfuro basado en la formación de excímeros.

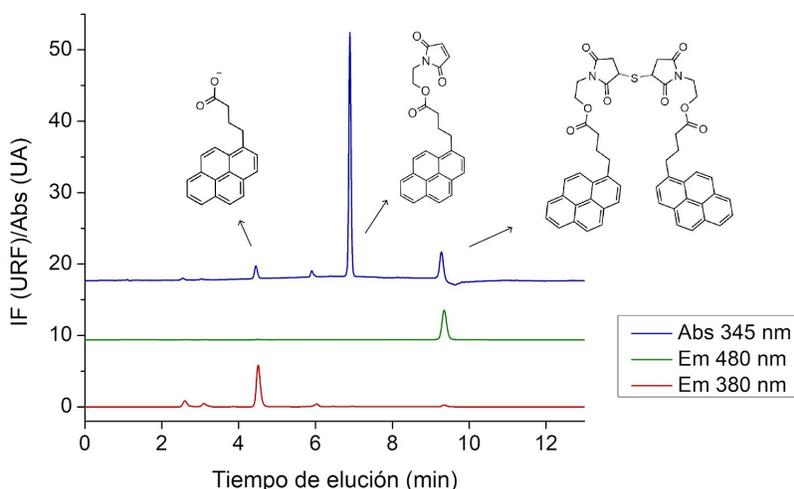


Figura 28: Separación de los productos de reacción por cromatografía de fase reversa. Cromatograma de una inyección de 5 μL de una dilución 1/100 de la reacción de MEPB (200 μM) con sulfuro (50 μM) por 20 min a 25 $^{\circ}\text{C}$, obtenido en una columna de fase reversa C18. Se muestra la absorbancia a 345 nm, y la emisión a 380 y 480 nm (λ_{ex} 345 nm) de la misma corrida y las estructuras de las moléculas a las cuales se les atribuye los distintos picos de absorción a 345 nm.

Optimización de las condiciones de trabajo

Estudio del solvente

Efecto de la polaridad del solvente

Se aprecian diferencias marcadas en los espectros de los productos de reacción cuando se diluyen en solventes con distintos niveles de polaridad: Tris (0,1 M, pH 8,5), acetonitrilo, y la mezcla Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1) (Figura 29). Al utilizar sólo amortiguador Tris podemos apreciar la emisión del monómero excitado de GSH con MEPB en los picos a 380 y 400 nm, pero no se aprecia el pico correspondiente a los excímeros a 480 nm en las reacciones con sulfuro y DTT, sólo picos de baja intensidad a 380 y 400 nm. La ausencia de emisión de excímeros se puede adjudicar a la precipitación de los derivados dialquilo por su baja solubilidad en estas condiciones de solvente. Cuando se usa sólo acetonitrilo como solvente, el pico para los excímeros es de baja intensidad tanto para sulfuro como para DTT, probablemente debido a un menor rendimiento en la formación de los mismos, ya que el bajo momento dipolar de este solvente competiría por las interacciones hidrofóbicas entre los pirenilos. Para la reacción con GSH se aprecia un pico a 480 nm y se pierden los picos característicos del monómero excitado a 380 y 400 nm, lo que podría indicar una formación espontánea de excímeros en este solvente por atracción de los grupos polares de los motivos glutationilo, que promoverían por cercanía el apilamiento de los grupos pirenilo y formación de excímeros por los derivados monoalquilo. Al utilizar la mezcla de acetonitrilo y Tris es cuando los picos a 480 nm, para las reacciones con sulfuro y DTT, y los picos a 380 y 400 nm para la reacción con GSH son mayores y no se aprecia el pico correspondiente a excímeros artefactuales. Este nivel de polaridad fue óptimo para permitir la formación de excímeros con mayor rendimiento, pero sólo cuando la proximidad entre los pirenos está dada por su localización en la misma molécula.

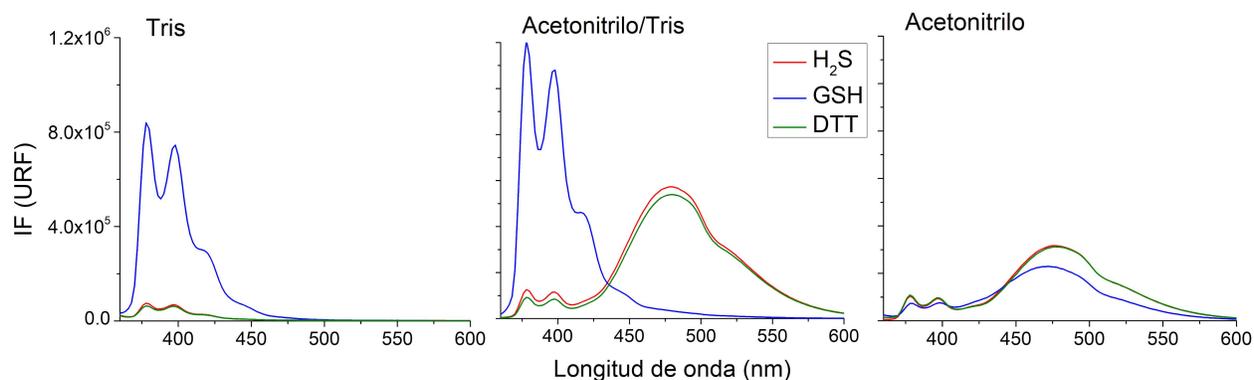


Figura 29: Efecto de la polaridad del solvente en la generación de excímeros. Espectros de emisión (λ_{ex} 345 nm) de las reacciones de MEPB (200 μM) con sulfuro, GSH o DTT (50 μM) en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1) por 20 min a 25 $^{\circ}\text{C}$, y luego diluidos 1/50 en los solventes especificados: Tris (0,1 M, pH 8,5), acetonitrilo, o Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1).

Etanol como solvente alternativo

Se evaluó la capacidad del etanol 70% como solvente orgánico para sustituir al acetonitrilo en la reacción con MEPB, ya que presenta la ventaja de ser más económico y amigable con el ambiente.

En el curso temporal de la reacción de sulfuro con MEPB en Tris (0,1 M, pH 8,5)/etanol 70% (1:1) no se aprecia un aumento significativo de la emisión a 480 nm hasta los 25 min de reacción (figura 30 A). El valor de emisión final resultó ser de un orden de magnitud menor que para la reacción utilizando acetonitrilo como solvente orgánico, lo que se interpreta como incapacidad de la reacción de suceder en dichas condiciones de solvente en un margen de tiempo útil.

Uso de etanol en la dilución posterior a la reacción

Al probar la mezcla de Tris (0,1 M, pH 8,5)/etanol 70% (1:1) como solvente para la dilución final, luego de la reacción en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1), se aprecian espectros con forma e intensidades comparables a las obtenidas al utilizar la mezcla de Tris con acetonitrilo (figura 30 B). Se observan los picos a 380 y 400 nm para el producto de la reacción de MEPB con GSH, y el pico a 480 nm correspondiente a la formación de excímeros del producto de sulfuro con dos moléculas de MEPB. Estos resultados indican que es posible la utilización de la mezcla Tris (0,1 M, pH 8,5)/etanol 70% (1:1) como solvente de la dilución posterior a la reacción en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1).

Considerando que la reacción entre sulfuro y MEPB no parece ocurrir favorablemente en etanol, y por conveniencia, se opta por la utilización de acetonitrilo como solvente orgánico.

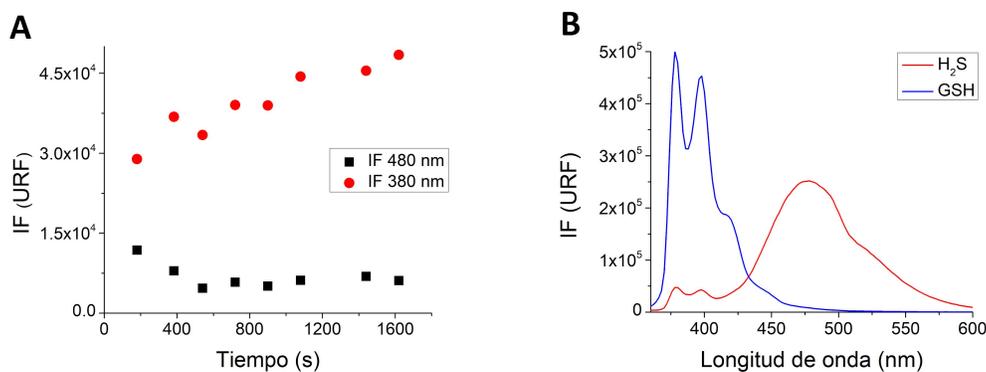


Figura 30: Efecto del etanol en el desarrollo de la reacción del MEPB con sulfuro y en la dilución de los productos de reacción con MEPB en Tris/acetonitrilo. A) Curso temporal de la reacción de MEPB (200 μM) con sulfuro (50 μM) en Tris (0,1 M, pH 8,5)/etanol 70% (1:1). Se mide la intensidad de fluorescencia a 380 y 480 nm (λ_{ex} 345 nm) de diluciones 1/400 en el mismo solvente. B) Espectros de emisión (λ_{ex} 345 nm) de la dilución 1/400 en Tris (0,1 M, pH 8,5)/etanol 70% (1:1) de los productos de la reacción de MEPB (200 μM) con sulfuro o GSH (50 μM) obtenidos en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1) por 20 min a 25 $^{\circ}\text{C}$.

Estabilidad de MEPB frente a la hidrólisis alcalina

A mayor pH, es mayor la proporción de moléculas de H_2S que se encuentran en forma de bisulfuro (HS^-), que es una especie más nucleofílica. En este sentido, es de interés el uso de pHs por encima del primer pK_a del sulfuro (pK_{a1} 7,0)¹¹³ para lograr velocidades de reacción mayores. Esta desprotonación en la fase acuosa también promueve la solubilización del H_2S y contribuye a mantener una menor cantidad de moléculas en la fase gaseosa, más difícil de controlar experimentalmente. Para evaluar la utilización de pHs por encima de 8,5, se procedió a estudiar la estabilidad de la molécula MEPB a pH 9 y 10, en los cuales se puede asumir que la cantidad de H_2S en la fase gaseosa es despreciable. Vista la posibilidad de hidrólisis de la sonda MEPB, es necesario controlar esta reacción de manera de validar la utilización de dichos pHs.

Considerando a la hidrólisis de la molécula MEPB (esquemática en la figura 24) y denominando PB y HM a los productos de hidrólisis, (ácido 4-(1-pirenil)butirato y N-(2-hidroxietil)maleimida, respectivamente), se puede definir la velocidad de dicha reacción en función de $[MEPB]$ y $[PB]$:

$$v = -\frac{d[MEPB]}{dt} = \frac{d[PB]}{dt} = [MEPB][OH^-]k_1 \quad (\text{Ec. 32})$$

Como estamos trabajando con soluciones con amortiguadores de pH, podemos asumir que $[OH^-]$ es constante y simplificar la Ec. 32:

$$v = -\frac{d[MEPB]}{dt} = \frac{d[PB]}{dt} = [MEPB]k_{OBS} \quad (\text{Ec. 33})$$

$$k_{OBS} = k_1[OH^-] \quad (\text{Ec. 34})$$

Tenemos una reacción de pseudo-primer orden y $[PB]$ en el tiempo queda definida como:

$$[PB]_t = [MEPB]_0 - [MEPB]_0 \cdot e^{-k_{OBS}t} \quad (\text{Ec. 35})$$

Donde PB es el producto fluorescente como monómero excitado, por lo que se puede seguir la reacción de hidrólisis con la emisión a 380 nm y el curso temporal en estas condiciones debería seguir un comportamiento exponencial.

La emisión a 380 nm aumentó en el tiempo luego del contacto de MEPB con los amortiguador borato (0,1 M) pH 9 y pH 10 (Figura 31), lo que indica que se produce la hidrólisis alcalina del enlace éster de la molécula MEPB, para dar 4-(1-pirenil)butírico, fluorescente como monómero excitado. A los cursos temporales de la emisión a 380 nm se le pueden ajustar funciones exponenciales simples en ambos casos. Las gráficas muestran que a las 2 horas, aproximadamente, la reacción de hidrólisis se completa. El valor final de intensidad de fluorescencia es el mismo en ambos casos, y corresponde a la emisión de 10 μ M iniciales del producto de hidrólisis de MEPB.

Las k_{OBS} para las reacciones de hidrólisis son de $6,0 \times 10^{-4}$ y $6,3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ a pH 9 y 10 respectivamente, lo que implica un tiempo medio para la reacción de hidrólisis de aproximadamente 19 minutos en ambos casos. Por lo tanto, no es conveniente realizar ensayos a pH mayores a 8,5 por la rápida hidrólisis del grupo éter del MEPB, lo que implicaría una competencia por el consumo de MEPB entre su reacción con el sulfuro y la reacción de hidrólisis.

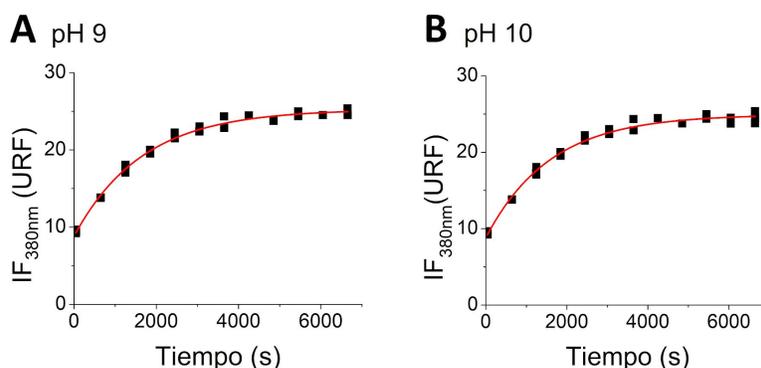


Figura 31: Efecto del pH en la hidrólisis en el MEPB. Medidas de intensidad de fluorescencia a 380 nm en el tiempo (λ_{ex} 345 nm) a diluciones 1/40 del producto de hidrólisis de 10 μ M de MEPB en A) borato (0,1 M, pH 9)/acetonitrilo (1:1) y B) borato (0,1 M, pH 10)/acetonitrilo (1:1).

Se determinó que la sonda MEPB y los productos de su reacción con GSH, DTT y sulfuro precisan de una determinada polaridad para solubilizarse correctamente y emitir de manera óptima y diferencial. Dicha polaridad fue obtenida a partir de la mezcla 1:1 del solvente acetonitrilo con un medio acuoso. El pH de trabajo es un compromiso entre la desprotonación del H_2S y la posibilidad de hidrólisis alcalina de la sonda. Para evitar en mayor medida la ruptura del enlace éster de la sonda y de manera de tener una concentración significativa de la especie nucleofílica, bisulfuro, se considera que el pH óptimo de trabajo para la detección de sulfuro por su reacción con la sonda MEPB es de 8,5. En vista de esto es que la mezcla de solventes de elección para el método es la de Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1).

Optimización del tiempo de reacción

Cinética exploratoria

Se analizó la cinética de la reacción con fines de poder determinar el tiempo de vida media de la misma y así poder definir un tiempo de incubación para la reacción de MEPB. Primero se procedió a estudiar la reacción en condiciones de exceso de sulfuro. Como no conocemos las distintas constantes cinéticas, *a priori* no podemos anticipar la forma de los cursos temporales.

En la figura 32 se muestran los cursos temporales de las reacciones en condiciones de exceso de sulfuro. En todos los casos se aprecia la aparición de excímeros ya que se obtuvo valores de emisión a 480 nm, lo que indica formación del derivado dialquilo *MSM*. En base a estas observaciones, postulamos un modelo de reacción en dos pasos que involucran al MEPB:



donde *S* es el sulfuro y *MS* y *MSM* se corresponden a los productos de la reacción (tiol) y de la doble reacción (tioéter) entre ambos reactivos, respectivamente. Se plantean ambas reacciones como reversibles por el conocimiento de que se dan a través de adiciones de Michael, que pueden ser reversibles.

En base a este modelo, podemos definir los cambios de la concentración de las especies *MEPB*, *MS* y *MSM* de la siguiente manera:

$$-\frac{d[MEPB]}{dt} = k_1 \cdot [S] \cdot [MEPB] - k_{-1} \cdot [MS] + k_2 \cdot [MS] \cdot [MEPB] - k_{-2} \cdot [MSM] \quad \text{(Ec. 38)}$$

Al utilizar *[S]* en exceso podemos asumir que ésta se mantiene constante durante la reacción por lo que podemos sustituir por el siguiente término:

$$k_1 \cdot [S] = k_1' \quad \text{(Ec. 39)}$$

reescribiendo la derivada como:

$$-\frac{d[MEPB]}{dt} = k_1' \cdot [MEPB] - k_{-1} \cdot [MS] + k_2 \cdot [MS] \cdot [MEPB] - k_{-2} \cdot [MSM] \quad \text{(Ec. 40)}$$

Los cambios en la concentración de *MS* en el tiempo van estar dados por los dos pasos de la siguiente manera:

$$\frac{d[MS]}{dt} = k_1' \cdot [MEPB] - k_{-1} \cdot [MS] - k_2 \cdot [MS] \cdot [MEPB] + k_{-2} \cdot [MSM] \quad \text{(Ec. 41)}$$

Y la concentración del producto final *MSM* dependerá de la concentración de sus reactivos y de su propia concentración de la siguiente manera:

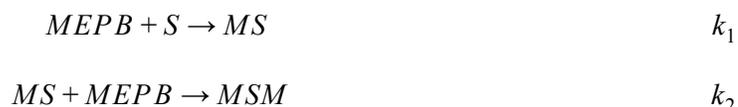
$$\frac{d[MSM]}{dt} = k_2 \cdot [MEPB] \cdot [MS] - k_{-2} \cdot [MSM] \quad \text{(Ec. 42)}$$

En condiciones de exceso de *[S]* el hecho de que haya habido formación del excímero *MSM* en todas las determinaciones implica que la segunda reacción es más rápida que la primera (

$k_2 \gg k_1$). Si las constantes fueran similares o $k_1 \gg k_2$, el sulfuro en exceso consumiría todo el MEPB formando exclusivamente MS. Esto es coherente con observaciones previas en las que se observó que el hidrosulfuro es peor nucleófilo que los tiolatos^{11,12}.

Como observamos cursos temporales complejos, requerimos de un software para su análisis. Se utilizó el programa Dynafit¹⁴ que permite el análisis matemático de datos en el tiempo por regresiones no lineales utilizando mínimos cuadrados, y permiten la comparación de distintos modelos cinéticos basados en los criterios de Akaike. Se definieron varios modelos con sus correspondientes constantes cinéticas y se le encomendó al programa el ajuste de los datos para obtener estimados para los valores de las constantes cinéticas y una ponderación de los modelos que se ajustan mejor a las observaciones. Se estudiaron los siguientes modelos con sus correspondientes códigos:

Modelo 1) R1i+R2i



Modelo 2) R1i+R2r



Modelo 3) R1r+R2i



Modelo 4) R1r+R2r



Modelo 5) R1i+R2i+hidr



Modelo 6) R1r+R2r+hidr

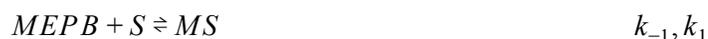




Modelo 7) R1i+R2ih+hidr



Modelo 8) R1r+R2rh+hidr



Los distintos modelos varían en las consideraciones de reversibilidad o irreversibilidad en las reacciones consecutivas de MEPB con sulfuro y algunos modelos consideran el consumo de la sonda por la reacción de hidrólisis para dar un producto no fluorescente a la longitud de onda de medida. Las variables que se ajustan son las distintas constantes cinéticas correspondientes a cada modelo y la respuesta fluorescente del producto *MSM*.

El análisis discriminatorio de modelos determinó que, con los datos cinéticos obtenidos de la reacción en exceso de sulfuro, dos modelos pasaron todos los criterios de aceptación. Estos fueron los modelos 4 y 5: el que considera las dos reacciones reversibles y el que toma ambas reacciones como irreversibles y considera el consumo de MEPB por su hidrólisis.

El modelo de dos reacciones reversibles resultó en valores de constantes cinéticas de

$$k_1 = 56 \pm 3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_{-1} = (5 \pm 2) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

$$k_2 = (4 \pm 1) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_{-2} = (1,7 \pm 0,9) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$$

Las constantes de equilibrio para cada paso están dadas por:

$$K_{eq} 1 = \frac{k_1}{k_{-1}} = 1,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$$

$$K_{eq} 2 = \frac{k_2}{k_{-2}} = 2,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$$

La relación entre la k_1 y la k_2 es de dos órdenes de magnitud, coherente con el hecho de que se observe producto MSM en las reacciones con exceso de sulfuro, ya que ésto implica que $k_1 \gg k_2$ como se discutió anteriormente. Las constantes de equilibrio estimadas son del orden de 10^5 y 10^6 para ambos pasos, lo que implica que ambas reacciones pueden considerarse como irreversibles a los efectos prácticos.

Para el modelo de dos reacciones irreversibles considerando la hidrólisis de la sonda, las constantes cinéticas obtenidas por el ajuste fueron:

$$k_1 = 71 \pm 3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_2 = (5 \pm 2) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$k_3 = (8 \pm 3) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

En este caso la relación entre la k_1 y la k_2 también es de dos órdenes de magnitud. El valor estimado para la constante cinética para la hidrólisis, k_3 , es concordante con las constantes obtenidas a partir de los experimentos de hidrólisis (figura 31), ya que se encuentra dentro del mismo orden.

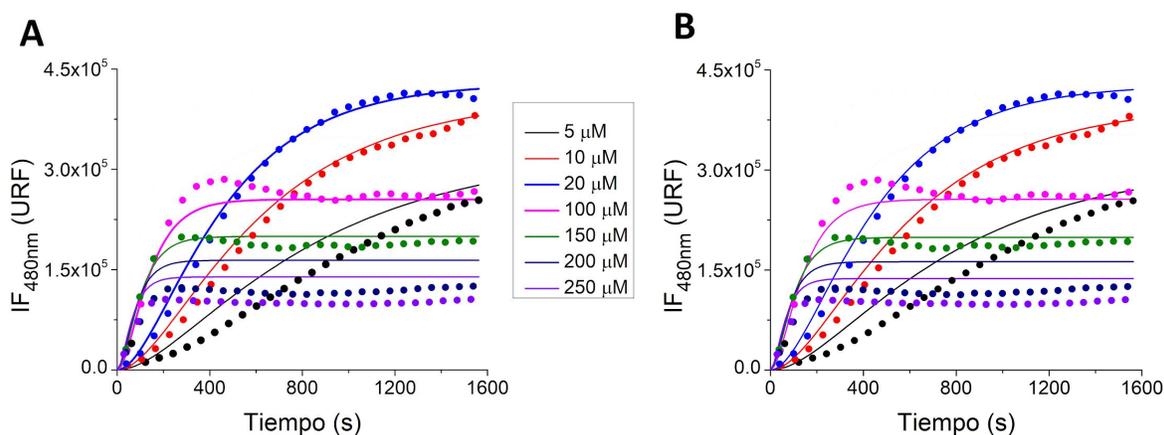


Figura 32: Cinética en condiciones de exceso de sulfuro frente a MEPB. Cursos temporales de las reacciones de MEPB (705 nM) con distintas concentraciones de sulfuro en exceso a 25 °C en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1), seguidos por intensidad de fluorescencia a 480 nm (λ_{ex} 345 nm) (puntos). Las líneas corresponden a los ajustes del programa Dynafit a A) el modelo de las dos reacciones irreversibles considerando la hidrólisis de la sonda MEPB y B) el modelo de reacción en dos pasos, ambos reversibles.

Cinética de pseudo-primer orden para MEPB

En el caso de tener MEPB en exceso, podemos asumir que su concentración se mantiene constante durante la reacción y las dos etapas de la reacción se vuelven de pseudo-primer orden. La aparición de producto en condiciones de exceso de $MEPB$ tiene una dependencia exponencial con el tiempo como se muestra en la figura 33. En base a estos resultados planteamos el cambio en la concentración de las especies S , MS y MSM en el tiempo como:

$$-\frac{d[S]}{dt} = k_1 \cdot [S] \cdot [MEPB] \quad (Ec. 45)$$

Como nos encontramos en condiciones de exceso de $[MEPB]$:

$$k_1 \cdot [M] = k_1' \quad (Ec. 46)$$

Y reescribir la derivada como:

$$-\frac{d[S]}{dt} = k_1' \cdot [S] \quad (Ec. 47)$$

El cambios en la concentración de MS en el tiempo va estar dada por los dos pasos de la reacción de la siguiente manera:

$$\frac{d[MS]}{dt} = k_1 \cdot [S] \cdot [MEPB] - k_{-1} \cdot [MS] - k_2 \cdot [MS][MEPB] + k_{-2} \cdot [MSM] \quad (Ec. 48)$$

Con la misma lógica del exceso de M podemos replantear los dos primeros términos, sustituyendo por la Ec. 48 y por:

$$k_2 \cdot [M] = k_2' \quad (Ec. 49)$$

$$\frac{d[MS]}{dt} = k_1' [S] - k_{-1} \cdot [MS] - k_2' \cdot [MS] + k_{-2} \cdot [MSM] \quad (Ec. 50)$$

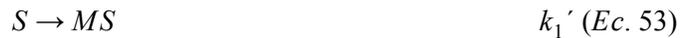
A partir de los datos del ajuste preliminares en el programa Dynafit sabemos que $k_2 \gg k_{-2}$ y que $k_1 \gg k_{-1}$, podemos asumir que son pasos es irreversibles y despreciar dos términos para obtener:

$$\frac{d[MS]}{dt} = k_1' [S] - k_2' [MS] \quad (Ec. 51)$$

La aparición del producto final MSM puede plantearse siguiendo las mismas simplificaciones que venimos haciendo, como:

$$\frac{d[MSM]}{dt} = k_2' [MS] \quad (Ec. 52)$$

De esta manera, la aparición del producto MSM queda definida como la suma de dos reacciones de pseudo primer orden irreversibles consecutivas:



La variación de la concentración del producto final MSM en el tiempo puede plantearse como¹¹⁵:

$$[MSM]_t = [S]_0 \left[1 - \frac{1}{k_2' - k_1'} (k_2' \cdot e^{-k_1' t} - k_1' \cdot e^{-k_2' t}) \right] \quad (Ec. 55)$$

A partir de los datos del ajuste al programa Dynafit en condiciones de sulfuro en exceso sabemos que $k_1 \ll k_2$ por lo que podemos simplificar esta ecuación despreciando k_1 frente a k_2 :

$$[MSM]_t = [S]_0 \left[1 - \frac{k_2' \cdot e^{-k_1' t}}{k_2'} \right] \quad (Ec. 56)$$

Finalmente, obtenemos una expresión exponencial para la aparición del producto final, MSM en el tiempo dependiente únicamente de k_1' según:

$$[MSM]_t = [S]_0 - [S]_0 \cdot e^{-k_{OBS}t} \quad (Ec. 57)$$

Donde k_{OBS} equivale a k_1' . A la intensidad de fluorescencia a 480 nm, correspondiente a la formación de excímeros MSM (figura 33), se le ajustó una ecuación exponencial más recta para obtener el valor de k_{OBS} .

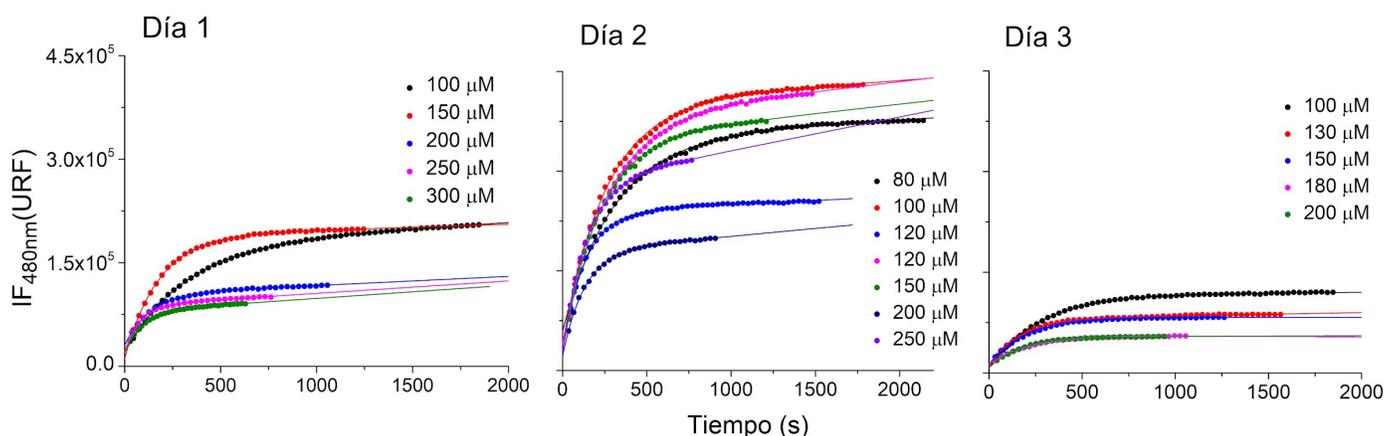


Figura 33: Cinética de pseudo-primer orden para MEPB. Cursos temporales de la reacción de sulfuro (5 μM) con distintas concentraciones de MEPB en exceso a 25 $^{\circ}\text{C}$ en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1). Los puntos son datos de emisión a 480 nm (λ_{ex} 345 nm) sin hacer diluciones en cubetas de 4 mm de paso óptico, y las líneas son los modelos de funciones exponenciales más recta ajustadas a los datos, en resultados de tres días independientes.

El ajuste a una ecuación exponencial más recta fue el que dió un ajuste mejor, a juzgar por los residuales. La parte exponencial se corresponde a las dos reacciones consecutivas que dan la formación del producto dialquilo MSM como se muestra en la ecuación 57, mientras que la recta puede interpretarse como en aumento en la fluorescencia a 480 nm dada por la hidrólisis o fotólisis de la sonda $MEPB$. Si bien ya sabemos que el producto de hidrólisis PB es incapaz de formar excímeros, es probable que su emisión característica como monómero excitado a 380 nm tenga una influencia a 480 nm por lo ancho de su pico. Los valores de las pendientes se mantienen dentro del mismo orden en todos los casos (figura 34), esto es coherente con el hecho de que la fotólisis e hidrólisis no varía significativamente entre los experimentos, ya que se realizaron en condiciones de solvente y de exposición a la luz similares. Los valores observados son realmente bajos, indicando que la hidrólisis es despreciable en estos tiempos de incubación.

De la pendiente de la gráfica de k_{OBS} en función de la concentración de MEPB (Figura 34) se obtuvo una $k_1 = 34 \pm 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ según la definición de la constante observada:

$$k_{OBS} = k_1' = [M] \cdot k_1 \quad (Ec. 58)$$

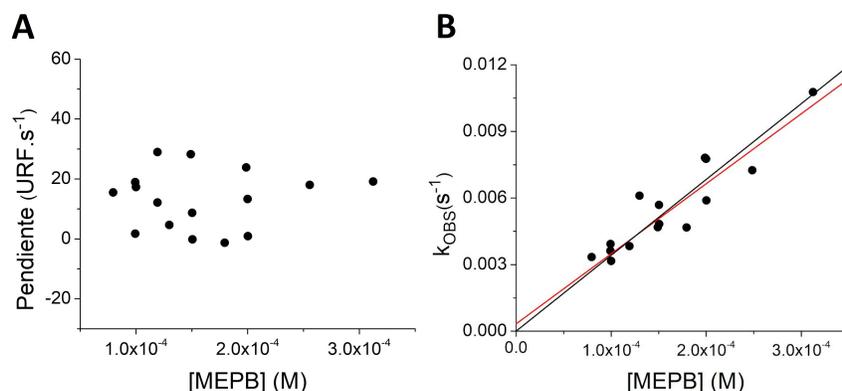


Figura 34: Parámetros obtenidos de los ajustes de los cursos temporales con exceso de MEPB. Valores de A) pendientes y B) constantes observadas en función de la concentración de MEPB obtenidos a partir de los ajustes de modelos de exponenciales más recta a los cursos temporales de las reacciones de la figura 33.

El ajuste tuvo un $R^2 > 0,97$ y los residuales se distribuyeron de forma aleatoria. Los ajustes no variaron significativamente cuando se fijó el cero (ajuste negro) a cuando no se fijó (ajuste rojo), se optó por calcular la k_1 en el ajuste forzado por 0.

Teniendo en cuenta este valor más confiable de k_1 , reiteramos el análisis discriminador de modelos del Dynafit fijando el valor de dicha constante. En este caso, el único modelo elegido por el programa resulta ser el de la primera reacción irreversible y la segunda reacción reversible (modelo 2). Los valores de constantes obtenidos resultaron ser los siguientes.

$$k_2 = (6,2 \pm 0,9) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$k_{-2} = (1,0 \pm 0,1) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$$

De esta manera obtenemos un valor para la constante del segundo paso, k_2 , con un error significativamente menor (14 %) que el obtenido del ajuste previo (35 y 38 %).

El valor de la constante cinética obtenida para k_1 ($34 \pm 1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), paso limitante de la cinética de formación del dímero covalente, nos permitió determinar un tiempo de incubación para método. El tiempo de incubación se estimó como 10 vidas medias determinadas a partir de la k_1 y la concentración de la sonda utilizada (200 μM): 17 minutos.

Estudio de la reacción de ZnS con MEPB

Dada la alta afinidad del Zn^{2+} en solución por el S^{2-} ($K_{ps} 4,8 \times 10^{-23}$)¹¹⁶ para dar lugar a la formación de partículas de ZnS, se estudió la posibilidad de atrapamiento del sulfuro gaseoso y en solución mediante su reacción con acetato de zinc. De esta manera, a partir de alícuotas de muestras en solución, se podrían detener reacciones que impliquen el consumo de sulfuro y evitar la posible pérdida de sulfuro de las muestras en la fase gaseosa. Si las muestras fueran de origen gaseoso, su incubación con una solución de Zn^{2+} permitiría concentrar el sulfuro en una suspensión acuosa. Adicionalmente, el atrapamiento del sulfuro como ZnS permitiría iniciar de forma simultánea la reacción con MEPB de muestras tomadas en distintos tiempos, controlando de

mejor manera las condiciones de reacción. Para permitir la reacción de sulfuro atrapado con MEPB es necesaria su liberación del precipitado de ZnS. Esto se logra mediante el agregado de un quelante fuerte, como el DTPA¹⁷. Debido a su alta afinidad por estos cationes, esta molécula lograría quelar el Zn²⁺ liberando así al S²⁻ a la solución y permitiendo su reacción con MEPB.

Atrapado de H₂S en partículas de ZnS

La reacción directa de sulfuro con MEPB muestra un aumento de la intensidad a 480 nm (figura 35 A, puntos negros), correspondiente a la formación de excímeros, similar a las obtenidas previamente. Sin embargo, las partículas de ZnS fueron incapaces de reaccionar con MEPB. Cuando primero se da la reacción entre Zn²⁺ y sulfuro, para luego iniciar el curso temporal con el agregado de MEPB, no se aprecia aumento en la intensidad a 480 nm (figura 35 A, puntos rojos). Esto confirma el atrapado de todo el sulfuro presente en la forma de ZnS. Cuando se agrega DTPA junto con el MEPB sí se aprecia la reacción, mediante el aumento exponencial de la intensidad a 480 nm (figura 35 A, puntos azules). Esto se da por el hecho de que el DTPA es capaz de competir con el S²⁻ para quelar al Zn²⁺, liberando al sulfuro y permitiendo su reacción con el MEPB. Los valores obtenidos con el método con Zn²⁺ y DTPA alcanzan una amplitud mayor que la del control (curso temporal negro), lo que indica una mayor cantidad de sulfuro reaccionando con MEPB. Este fenómeno se puede interpretar como una leve pérdida de sulfuro en la fase gaseosa al no preincubar con la solución con Zn²⁺, es decir, se observa un mejor rendimiento en la detección de sulfuro cuando se atrapa en partículas de ZnS.

Cinética del método Zn²⁺-DTPA

La velocidad de formación de excímeros con el método Zn²⁺-DTPA es dependiente de la concentración de DTPA, como se aprecia en la figura 35 B. Esto indica que el paso limitante de la reacción en estas condiciones es el quelado de Zn²⁺ y liberación de S²⁻. El uso de 2 mM DTPA permite desarrollar la reacción de formación de excímeros con una k_{OBS} de $(33 \pm 3) \times 10^{-4} s^{-1}$ que corresponde a una vida media de 3,5 min lo que implica que la reacción se puede considerar completa en 35 minutos.

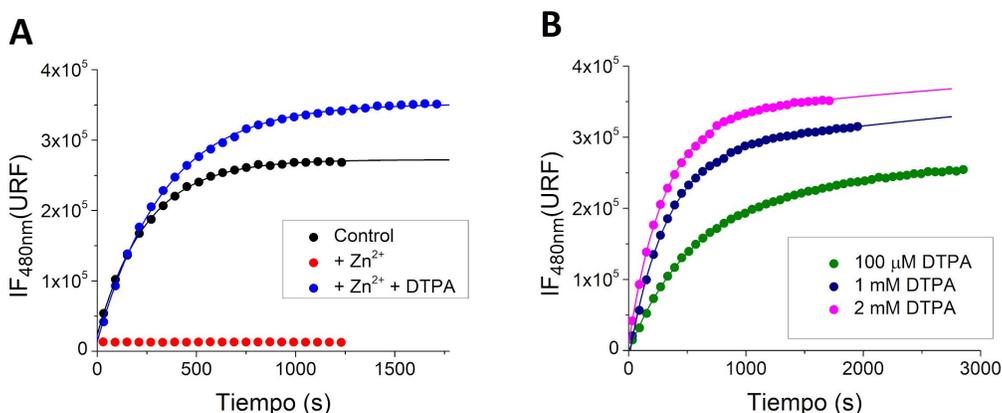


Figura 35: Utilización de Zn²⁺ para atrapar sulfuro y dependencia de la velocidad de la reacción entre sulfuro y MEPB con la concentración de DTPA. A) Cursos temporales de la reacción de MEPB (200 μM) con sulfuro (10 μM) en distintas condiciones: a) control de la reacción convencional (negro), b) incubación previa del sulfuro por 5 min con Zn²⁺ (50 μM) en Tris (0,1 M, pH 8,5) y luego agregado del MEPB (rojo), c)

incubación previa del sulfuro con Zn^{2+} ($50 \mu M$) y agregado de DTPA (2 mM) junto con el MEPB (azul). Todas las reacciones con el MEPB ocurrieron en Tris ($0,1 \text{ M}$, $\text{pH } 8,5$)/acetonitrilo ($1:1$) como solvente final a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. B) Cursos temporales de la reacción de MEPB ($200 \mu M$) con sulfuro ($10 \mu M$) con incubación previa por 5 min con Zn^{2+} ($50 \mu M$) en Tris ($0,1 \text{ M}$, $\text{pH } 8,5$) e iniciada con el agregado del MEPB y DTPA según lo especificado (puntos). Todas las reacciones con el MEPB ocurrieron en Tris ($0,1 \text{ M}$, $\text{pH } 8,5$)/acetonitrilo ($1:1$) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Se ajustaron modelos de funciones exponenciales más recta a los cursos temporales (líneas).

Linealidad y límite de detección

Para poder determinar la concentración de sulfuro a partir de la formación de excímeros en su reacción con MEPB, es necesario que la señal de fluorescencia correspondiente a esta especie exhiba una relación lineal con la concentración de sulfuro. Se realizaron curvas de calibración, haciendo reaccionar cantidades conocidas de sulfuro con MEPB, midiendo la emisión de los excímeros, y ajustando los datos a una recta, en la cual se puede interpolar los valores de fluorescencia de una muestra problema.

Estudio de la linealidad en el rango micromolar

Existe linealidad en la respuesta de emisión de excímeros con la concentración de sulfuro en el rango micromolar bajo. En la figura 36 A se aprecia la curva de calibración con concentraciones de sulfuro de 0 - $25 \mu M$. El ajuste a una recta rindió un $R^2 > 0,99$ y existe muy poca dispersión y una distribución aleatoria en los datos como se aprecia en la gráfica de los residuales de dicho ajuste en función de la concentración de sulfuro (figura 36 B).

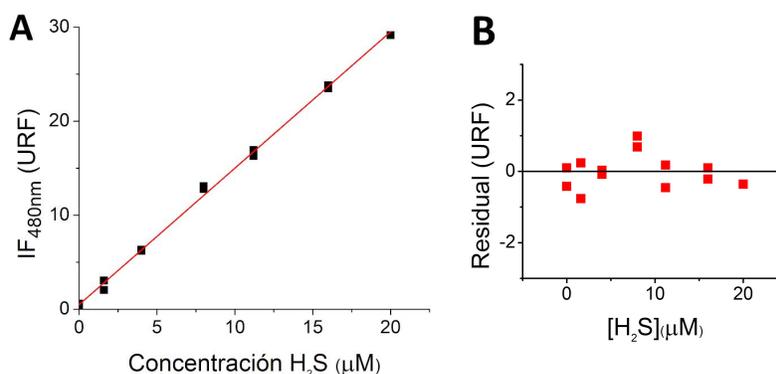


Figura 36: Curvas de calibración en el rango micromolar bajo. A) Intensidad de fluorescencia a 480 nm ($\lambda_{\text{ex}} 345 \text{ nm}$) en función de distintas concentraciones de sulfuro en reacción con MEPB ($200 \mu M$) por 20 min a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ en Tris ($0,1 \text{ M}$, $\text{pH } 8,5$)/acetonitrilo ($1:1$), y luego diluidos $1/40$. La línea roja corresponde al ajuste por regresión lineal. B) Residuales de dicho ajuste en función de la concentración de sulfuro.

También se aprecia linealidad en el rango submicromolar de sulfuro, con un ajuste lineal con un $R^2 > 0,96$ a los datos experimentales (Figura 37 A). Si bien existe una mayor dispersión en los valores de intensidad con respecto al ajuste lineal en comparación a la curva micromolar, los datos experimentales se alejan del ajuste sin una tendencia marcada como se aprecia en la figura 37 B. A partir de esta curva de calibración, se puede calcular un límite de detección del método de $0,1 \mu M$.

$$\text{Límite de detección} = \frac{\text{desviación estándar de ordenada en el origen} * 3}{\text{pendiente}} = 0,1 \mu M$$

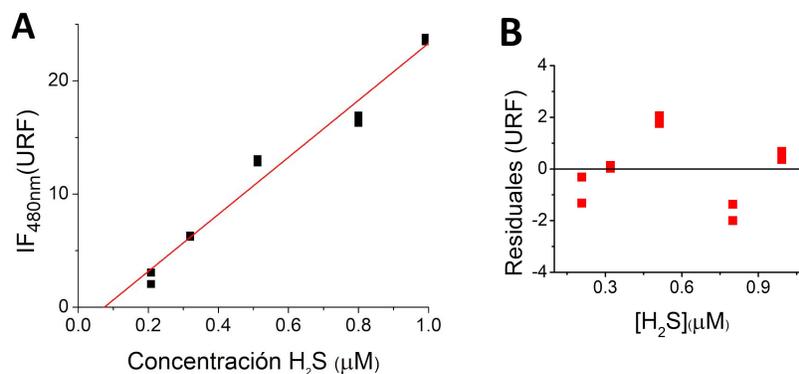


Figura 37: Curva de calibración submicromolar. A) Intensidad de fluorescencia a 480 nm (λ_{ex} 345 nm) en función de distintas concentraciones de sulfuro en reacción con MEPB (200 μ M) por 20 min a 25 °C en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1) y luego diluidos 1/40. El trazo rojo corresponde al ajuste por regresión lineal. B) Residuales de dicho ajuste en función de la concentración de sulfuro.

Se logró validar el método desarrollado para medidas de sulfuro en concentraciones micromolares y submicromolares. Se comprobó que existe linealidad en la respuesta fluorescente con la concentración de sulfuro para el método en dicho rango y se estableció un límite de detección. Tal linealidad es necesaria para poder utilizar la formación de excímeros con MEPB como metodología de medida cuantitativa de sulfuro. El método implica la necesidad de realizar una curva de calibración en simultáneo a las medidas problema, en las mismas condiciones. De esta manera se puede realizar un ajuste lineal a dicha curva y determinar la concentración de sulfuro en las muestras problema a través de la interpolación de los valores de fluorescencia en el ajuste lineal.

Estudio de la linealidad en la separación por HPLC

Búsqueda del rango de linealidad

Para estudiar la linealidad del método por separación por HPLC, se estudió la relación entre el área bajo la curva de la intensidad de fluorescencia a 480 nm del pico con tiempo de elución de 9,5 min y la concentración de sulfuro. Se determinó el tamaño de los picos con la inyección de 5 μ L de diluciones de la reacción de sulfuro (50 μ M) con MEPB (200 μ M) en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1) durante 20 min a 25 °C. Las concentraciones finales equivalentes a sulfuro fueron desde $1,5 \times 10^{-6}$ a $1,5 \times 10^{-10}$ M. En la gráfica de la figura 38 se ve que la linealidad mejora, con un R^2 mayor, de > 0.96 a > 0.99 en el ajuste cuando se excluye el valor de menor concentración, de $1,5 \times 10^{-10}$ M. Esto puede significar que en dicho rango la respuesta ya no es lineal con la concentración o que la presencia de trazas en el instrumento dificulta el trabajo a estos niveles.

Como se aprecia que desde el rango micromolar hasta el nanomolar existe una buena linealidad, se opta por explorar el rango nanomolar en mayor profundidad.

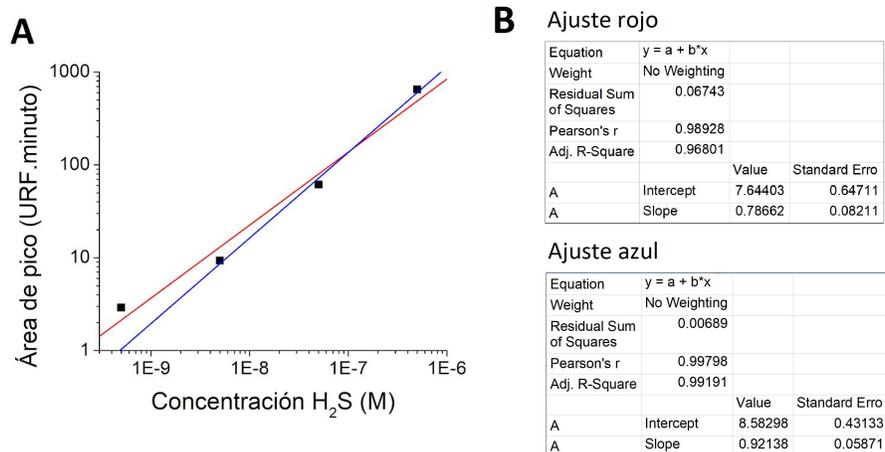


Figura 38: Curva de calibración de amplio rango preparada por dilución del dímero, analizado por HPLC. A) Área del pico de emisión a 480 nm (λ_{ex} 345 nm) con tiempo de elución de 9,5 min, en función de la concentración de sulfuro. Las áreas fueron obtenidas a partir de la integral de los picos tras la inyección de 5 μ L de distintas diluciones de la reacción de MEPB (200 μ M) con sulfuro (50 μ M) por 20 min a 25 °C en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1). Se ajustó una recta a los datos por mínimos cuadrados, por un lado, incluyendo al valor de menor concentración ($1,5 \times 10^{-10}$ M) y en otro caso excluyéndolo. B) Parámetros de los ajustes lineales incluyendo el valor de menor concentración (rojo) y excluyéndolo (azul)

Estudio de la linealidad en el rango nanomolar

Los cromatogramas de corridas de diluciones de los productos de reacción de sulfuro con MEPB muestran picos limpios de emisión a 480 nm con tiempo de elución 8,5 min, lo que se interpreta como una buena separación de los excímeros del resto de los componentes (figura 39 A). También se aprecia linealidad en la respuesta de intensidad de fluorescencia a 480 nm (figura 39 B), obtenida a partir de la integral de dichos picos, en función de la concentración final de sulfuro ($R^2 > 0,99$ y dispersión sin una tendencia marcada en los residuales) (figura 39 C).

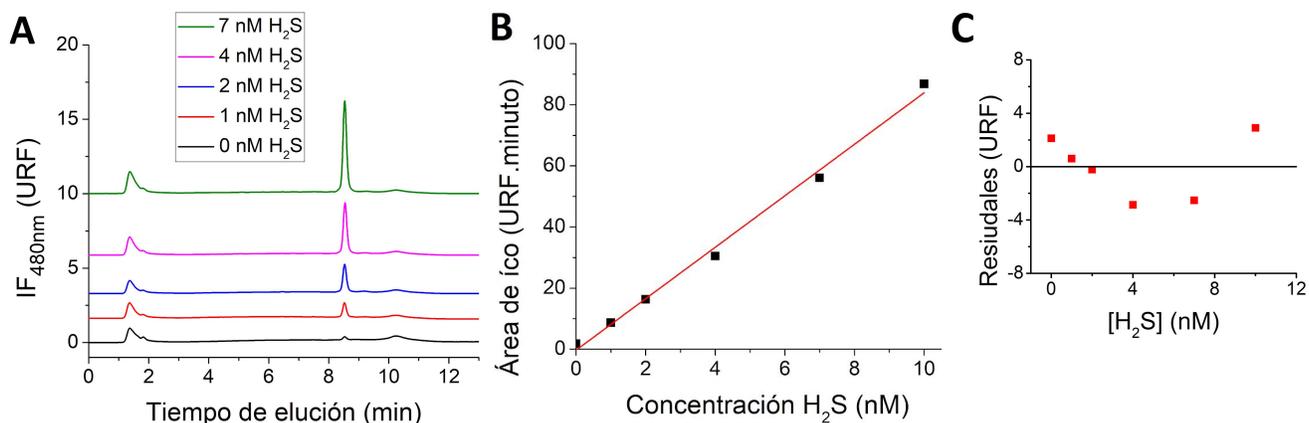


Figura 39: Curva de calibración en el rango nanomolar preparadas por dilución del dímero, analizado por HPLC. A) Cromatogramas correspondientes a la curva de calibración, obtenidos por la inyección de 5 μ L de distintas diluciones de los productos de la reacción de MEPB (200 μ M) con sulfuro (50 μ M) por 20 min a 25 °C en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1). Corridas cromatográficas utilizando el método nombrado en materiales y métodos. B) Área del pico de emisión a 480 nm (λ_{ex} 345 nm) con tiempo de elución de 8,5 min en función de la concentración de sulfuro. El trazo rojo es el ajuste por regresión lineal. C) Parámetros del ajuste lineal y residuales de dicho ajuste en función de la concentración de sulfuro.

Sin embargo, al realizar los análisis a partir de la reacción directa de MEPB (200 μM) con las correspondientes concentraciones de sulfuro en el rango 1-10 nM, se aprecian varios picos con emisión a 480 nm en los cromatogramas (figura 40). Ésto probablemente se deba a que la inyección de una gran cantidad de moléculas de MEPB (en este caso no se hace dilución) promueve su apilamiento en el sistema y la formación espontánea de excímeros, lo que a su vez implica una menor eficiencia en la separación de los productos de reacción. Además, debido a la alta sensibilidad del método, se pueden observar contaminantes presentes a muy baja concentración en la preparación de MEPB. La imposibilidad de calcular la integral de un pico aislado al tiempo de elución correspondiente a los productos de la doble reacción de MEPB con sulfuro, no permitió construir la curva de calibración. También se observa que la intensidad de los picos correspondientes a los excímeros en esta corrida (tiempo de elución 8,5 min) no reproducen los niveles obtenidos por diluciones de la reacción de MEPB (200 μM) con sulfuro (50 μM) que se muestran en la figura 39. Esto puede deberse a que al trabajar con una concentración de sulfuro en el rango nanomolar, se vuelve relevante el porcentaje de moléculas de sulfuro que reaccionan con el derivado de NEM, producto de hidrólisis de MEPB en la solución, sin brindar señal de fluorescencia y produciendo una interferencia negativa. Esto se ilustra en la figura 41, en la que se puede apreciar las posibles reacciones de sulfuro con los derivados maleimida en la solución de sonda. Dada la presencia de productos de hidrólisis de la sonda MEPB en la solución stock, comprobada a través de la emisión de la misma a 380 nm (λ_{ex} 345 nm) (figura 20), es posible la reacción de sulfuro con N-(hidroxietil)maleimida para dar productos no detectables por fluorescencia.

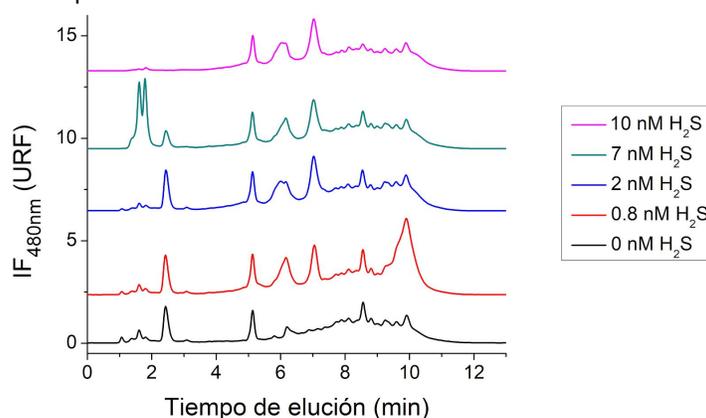


Figura 40: Detección nanomolar de sulfuro realizada por reacción directa y analizada por HPLC.

Emisión a 480 nm (λ_{ex} 345 nm) del cromatograma de la inyección de 5 μL de reacciones de MEPB (200 μM) con las correspondientes concentraciones de sulfuro por 20 min a 25 $^{\circ}\text{C}$ en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1). Corrida cromatográfica con el método nombrado previamente.

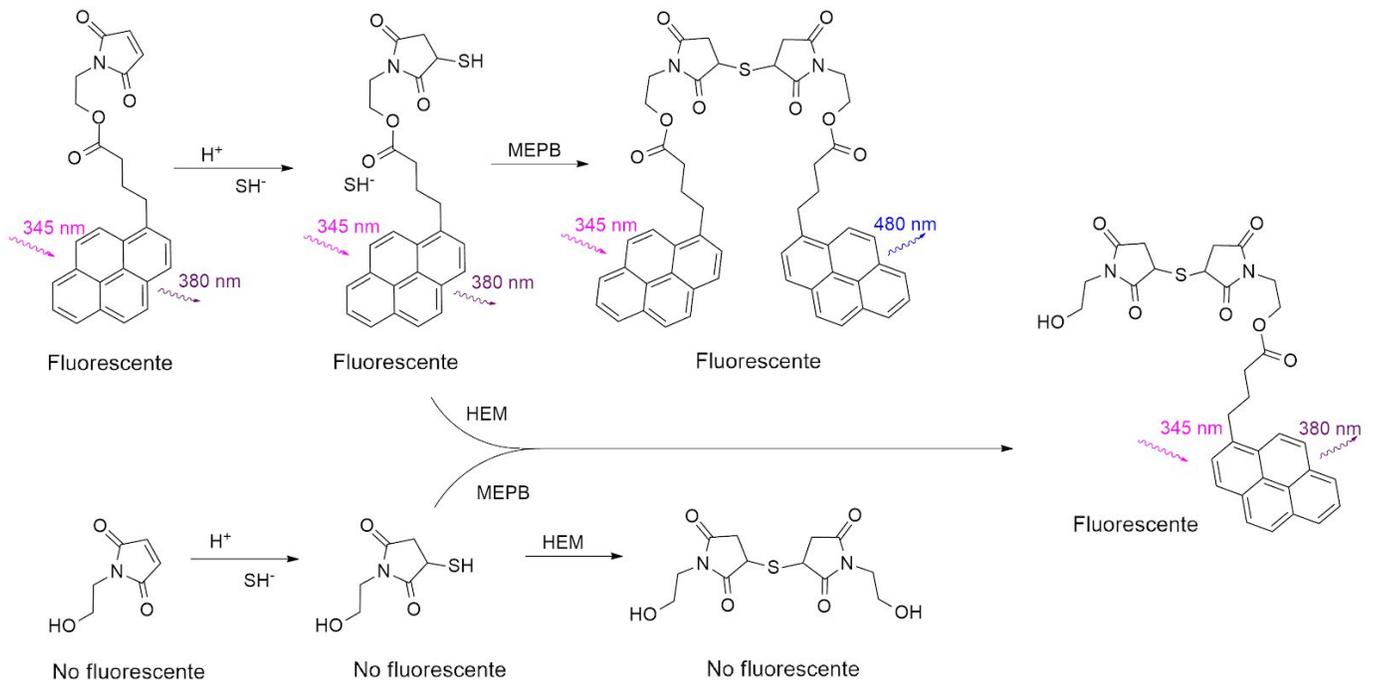


Figura 41: Posibles reacciones de HS⁻ con MEPB y productos secundarios. Esquema de tres posibles destinos del HS⁻ en la solución de MEPB: adiciones de Michael con la región α,β -insaturada de los carbonilos del grupo maleimida de la sonda íntegra (MEPB) o con su producto de hidrólisis N-(2-hidroxietil)maleimida (HEM) para dar productos fluorescentes y no fluorescentes, respectivamente. Existe una tercera opción: que el HS⁻ reaccione con HEM y MEPB para dar un derivado mixto que emite como monómero.

Al estudiar la sensibilidad del método luego de una separación por HPLC de los productos, se vio que ésta aumenta, ya que fue posible una detección nanomolar de excímeros de sulfuro y MEPB, pero fenómenos como el consumo de sulfuro por el producto de hidrólisis de la sonda o la formación espontánea de excímeros por su alto exceso interfieren con las medidas, imposibilitando la detección en dicho rango. El desarrollo de nuevas sondas con mayor resistencia a la hidrólisis y la optimización de métodos de separación de los productos podrían llegar a permitir bajar el límite de detección de sulfuro a partir de la formación de excímeros .

Linealidad de la respuesta en el método Zn²⁺-DTPA

Para verificar que la respuesta de emisión a 480 nm fuera lineal también en la reacción de ZnS con MEPB y DTPA, se midieron los productos de la reacción con distintas concentraciones de sulfuro.

En la figura 42 A se ve la linealidad en las curvas con y sin el uso de Zn²⁺ hasta valores de 8 μ M de H₂S, con R² > 0,95 en ambos casos. La curva de calibración del método Zn²⁺-DTPA tiene una pendiente mayor al control sin Zn²⁺, lo que comprueba la mayor retención de H₂S en la solución y optimización de la reacción con MEPB con este método, los valores de residuales muestran una dispersión menor en el caso de la curva de calibración del método Zn²⁺-DTPA (figura 42 B).

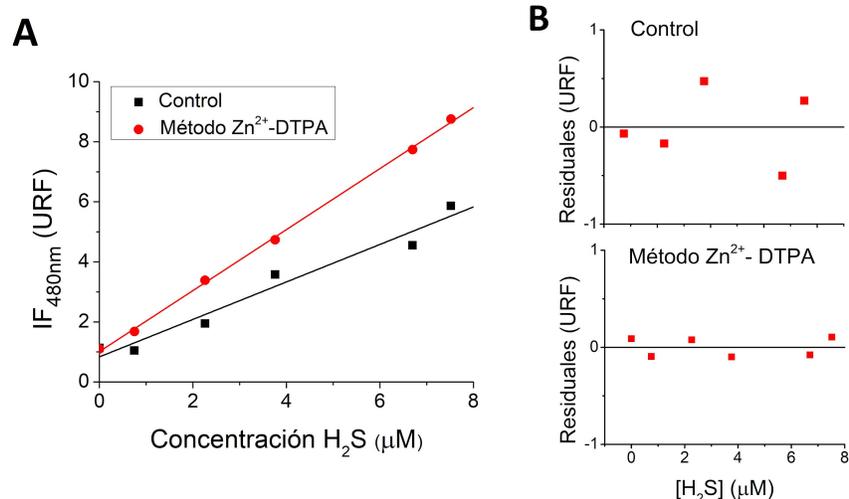


Figura 42: Curva de calibración con el método Zn²⁺-DTPA y residuales de ambos ajustes. A) Intensidad de fluorescencia en función de la concentración de sulfuro en dos condiciones. Como control se hicieron reaccionar distintas concentraciones de sulfuro directamente con MEPB (200 μM) por 20 min a 25 °C en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1) (negro). Para la curva del método Zn²⁺-DTPA, primero se hizo reaccionar sulfuro con exceso de Zn²⁺ (60μM) en Tris (0,1 M, pH 8,5) y luego con MEPB (200 μM), que se agregan en simultáneo con DTPA (2 mM), por 30 min a 25 °C (Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1) final). Se mide la intensidad de fluorescencia a 480 nm (λ_{ex} 345 nm) de diluciones 1/40 de los productos de reacción. B) Residuales de los ajustes lineales a las curvas de calibración de A, en función de la concentración de sulfuro.

A través de la realización en simultáneo de una curva de calibración del método convencional y del método Zn²⁺-DTPA, se confirma también la linealidad de la respuesta mediada por el atrapamiento con Zn²⁺, validando su uso para determinar cuantitativamente sulfuro.

Curva de calibración a partir de la fase gaseosa

Dada la naturaleza gaseosa del H₂S, así como el conocimiento de su coeficiente de reparto entre fases gaseosa y acuosa al pH de trabajo, es posible, en un sistema cerrado compuesto por dos fases de volúmenes conocidos, determinar la concentración de sulfuro en la fase acuosa de dicho sistema a partir de medidas en la fase gaseosa. Esto es de utilidad cuando se quiere determinar la concentración de sulfuro en sistemas acuosos complejos, que involucran células, extractos o distintos compuestos que podrían llegar a interferir en la cuantificación de sulfuro. Es con este fin que se realiza una curva de calibración de H₂S en la fase gaseosa de un sistema previamente descrito³³, que consta de una fase acuosa de 500 μL y una fase gaseosa de aproximadamente 20 mL, contenidas en una jeringa tapada con un septo y que se encuentra en agitación a 25 °C (figura 15).

Se realizó una curva de calibración en dicho sistema, inyectando 0,3 micromoles de sulfuro, de forma de tener una concentración de 12,6 μM en la fase gaseosa y 94,4 μM en la fase acuosa en el equilibrio. Luego de 20 min de incubación bajo agitación, se tomaron volúmenes desde 200 a 25 μL de la fase gaseosa y se burbujearon en una solución de Zn²⁺ en Tris (0,1 M, pH 8,5) en un vial sellado. Luego se agregó MEPB y DTPA para desarrollar la reacción y luego medir la emisión a 480 nm (λ_{ex} 345 nm) a diluciones.

Se aprecia linealidad en la curva de calibración realizada a partir de la fase gaseosa (figura 43 A). El ajuste a una recta de los datos experimentales dio un $R^2 > 0,97$ y los residuales de dicho ajuste muestran una dispersión sin tendencia (figura 43 B). La alta dispersión de los datos, se debe probablemente a una menor precisión propia de la manipulación de soluciones gaseosas.

Al confirmar la linealidad de la respuesta fluorescente con la concentración de sulfuro en fase gaseosa, se confirma la factibilidad de la metodología desarrollada para medidas cuantitativas de sulfuro en dicha fase, aportando un mecanismo adicional. La realización de cálculos en base al coeficiente de reparto y al pH de trabajo para esta variante de medidas en la fase gaseosa, sirve para determinar concentraciones de sulfuro en la fase acuosa de un sistema cerrado a partir de alícuotas tomadas de la fase gaseosa.

Se confirmó la linealidad de la respuesta fluorescente de emisión de excímeros de pireno con la concentración de sulfuro en distintas condiciones, validando las medidas cuantitativas. Cabe destacar que en todos los casos es necesaria la realización de curvas de calibración en simultáneo a las medidas para poder determinar la concentración de sulfuro en las muestras problema.

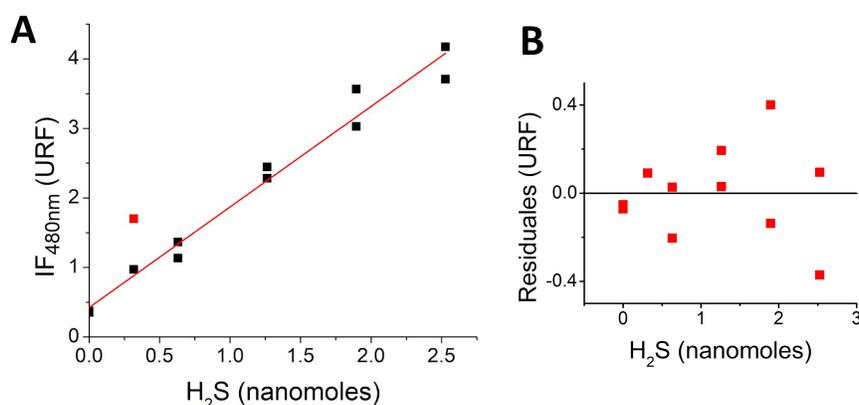


Figura 43: Curva de calibración tomando alícuotas de la fase gaseosa. A) Intensidad de fluorescencia a 480 nm (λ_{ex} 345 nm) en función de los moles de H₂S en reacción con MEPB, calculados a partir de la constante de Henry. Se inyectaron 30×10^{-8} moles de sulfuro en la fase acuosa del sistema. Luego de 20 min bajo agitación para permitir que se establezca el equilibrio entre las fases, se tomaron distintos volúmenes de la fase gaseosa de manera de tener el número de moles deseados. La muestra se burbujeó en viales sellados con Zn²⁺ (60 μ M) en Tris (0,1 M, pH 8,5), y luego se incubaron por 30 min con MEPB (200 μ M) y DTPA (2 mM). Se mide la emisión de fluorescencia de diluciones 1/40 de dichas soluciones. B) Residuales del ajuste por regresión lineal.

Análisis de posibles interferentes

Se estudia la reacción de moléculas que puedan encontrarse en distintos sistemas bioquímicos de estudio, como el aminoácido cisteína o el agente reductor TCEP, para ver si éstas son capaces de reaccionar con la sonda MEPB y generar una interferencia en las medidas de sulfuro. Se estudiaron moléculas nucleofílicas que probablemente podrían reaccionar por adiciones de Michael.

TCEP y la cisteína son capaces de reaccionar con el MEPB, ya que se aprecia señal de fluorescencia a 380 nm de sus productos correspondiente a monómeros excitados (figura 44 A), indicando la presencia de los correspondientes derivados monoalquilo. Ambos espectros muestran una forma similar al de la reacción con GSH, sin emisión a 480 nm, lo que indica que TCEP y cisteína no son capaces de promover la formación de excímeros. También se probó la reactividad de tiosulfato de sodio, pero éste no dio señal a ninguna longitud de onda (resultados no mostrados), por lo que se asume que no es lo suficientemente buen nucleófilo como para reaccionar con el MEPB en estas condiciones.

En la gráfica de barras se aprecian las intensidades a 380 nm correspondientes a los monómeros excitados y a 480 nm en la cual se mide la emisión de los excímeros para cada producto de reacción (Figura 44 B). Se observa que los productos de reacción de GSH, TCEP y cisteína brindan emisión a 380 nm, de intensidades comparables, pero solamente el DTT (el control positivo) y el sulfuro dan una emisión significativa a 480 nm. Si bien GSH, TCEP y cisteína reaccionan con MEPB, lo hacen sólo con una molécula de la misma, sin promover la formación de excímeros. A concentraciones equimolares, ninguno de los tres nucleófilos interfiere con la emisión correspondiente a la formación de excímeros por parte del producto de sulfuro con MEPB. Como se aprecia en la figura 44 B, la señal a 480 nm de los tres interferentes es insignificante en comparación a la emisión correspondiente a excímeros producto del sulfuro.

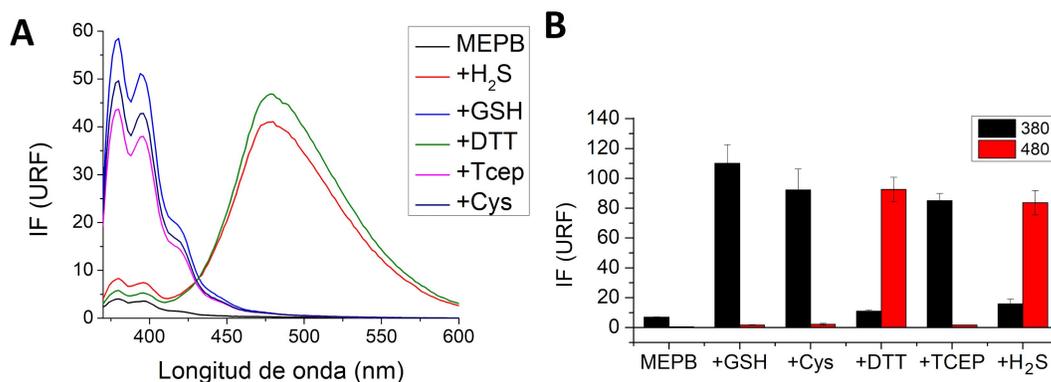


Figura 44: Efecto de interferentes en la determinación de sulfuro. A) Espectros de emisión (λ_{ex} 345 nm) con ancho de rendija de 5 nm de una solución de MEPB (200 μ M) o de su reacción con sulfuro, GSH, DTT, TCEP o Cys (50 μ M) por 20 min a 25 °C, y luego diluidos 1/400. B) Intensidad a 380 y 480 nm de las mismas soluciones, obtenidas con un ancho de rendija de 12 nm.

Se confirma la selectividad en la formación de excímeros con MEPB de dobles nucleófilos sobre nucleófilos simples, si bien algunos nucleófilos estudiados son capaces de reaccionar con la sonda MEPB, se confirmó su incapacidad de emitir como excímeros. Como en las muestras bioquímicas se suele encontrar altas concentraciones de tioles, muy por encima de las concentraciones de sulfuro reportadas, y vista la capacidad de emisión a longitudes de onda menores de los productos de reacción de MEPB con distintos nucleófilos, se procede a estudiar la interferencia en la detección de sulfuro del método por exceso de tioles.

Interferencia por tioles

Sí bien se comprobó la selectividad de la formación de excímeros por parte de los derivados dialquilo sobre los monoalquilo, la emisión a longitudes de onda mayores de los monómeros excitados debido al ancho de los picos podría implicar una interferencia en la emisión de los excímeros. Es por esto que se estudia la interferencia en la emisión de excímeros dependiente de la concentración de un tiol modelo, el GSH.

En la figura 45 A se ve un aumento en los picos a 380 y 400 nm con la concentración de GSH, mientras que la emisión a 480 nm se mantiene constante (Figura 45 B), coherente con que la cantidad de sulfuro presente en las reacciones sea la misma. Se aprecia que hasta concentraciones de un orden de magnitud mayor de tioles con respecto a la concentración de sulfuro, se puede diferenciar la señal de emisión de excímeros a 480 nm, ya que se mantiene sin sufrir incrementos importantes ($9,5 \pm 0,7$ URF). La variación sufrida por el pico corresponde a un 7 % de su intensidad y probablemente se deba a la incertidumbre introducida por la reproducibilidad ya que los valores no muestran una tendencia con la concentración del GSH presente.

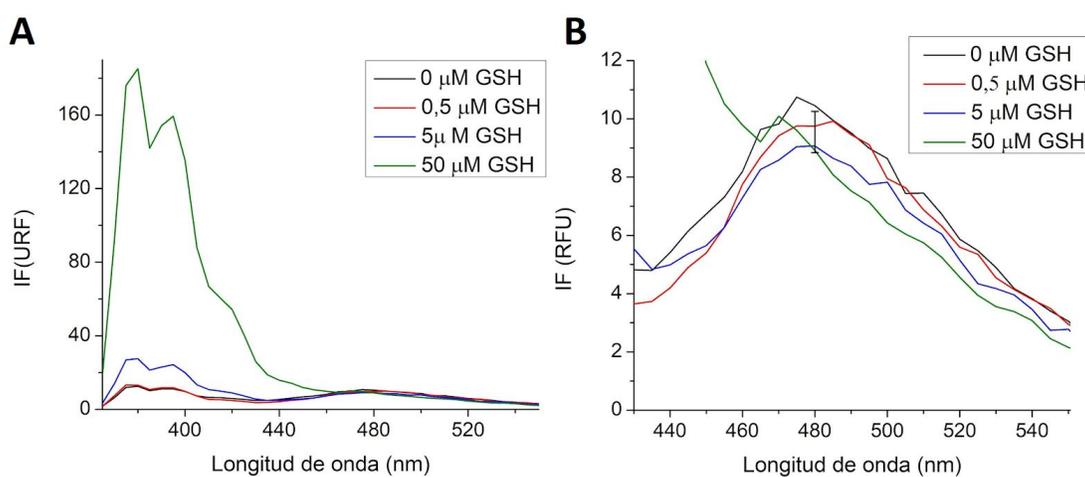


Figura 45: Interferencia producida por los tioles. A) Espectros de emisión (λ_{ex} 345 nm) de la reacción de MEPB (200 μM) con sulfuro (5 μM) y con distintas concentraciones de GSH. Las reacciones se incubaron por 20 min a 25 °C y se midieron los espectros de diluciones 1/40 de las mismas. B) Acercamiento de la misma gráfica donde se aprecian los picos a 480 nm con la barra de error correspondiente a la desviación estándar de intensidad, a dicha longitud de onda, del promedio de las cuatro reacciones.

Curva de calibración con exceso de GSH

De manera de estudiar en profundidad la interferencia generada por exceso de tioles, se procedió a realizar una curva de calibración de sulfuro con GSH a una concentración de un orden mayor. La figura 46 muestra los espectros de una curva de calibración con GSH en exceso. Se aprecia que los picos a 380 y 400 nm característicos del monómero excitado de GSH con MEPB se mantienen con intensidades similares en todos los casos, consistente con que la concentración de GSH en todas las reacciones es la misma. A 480 nm se ve el aumento en la emisión correspondiente a las distintas concentraciones de excímero, dada por la incubación con

distintas concentraciones de sulfuro. A simple vista se nota la influencia de la base de los picos a 380 y 400 nm sobre la intensidad a 480 nm.

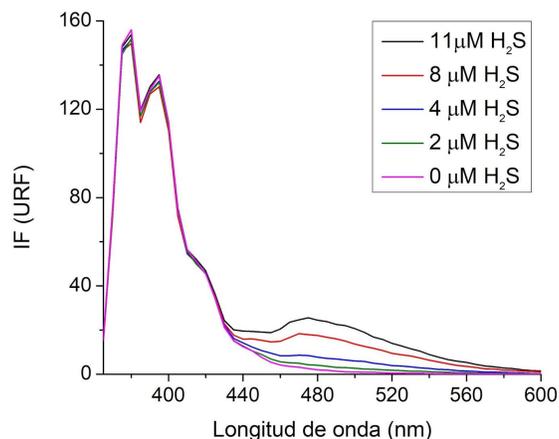


Figura 46: Espectros de la curva de calibración con exceso de GSH. Espectros de emisión (λ_{ex} 345 nm) de las reacciones de MEPB (200 μM) con GSH (50 μM) y sulfuro según especificado, por 20 min a 25 °C y diluidos 1/40 en Tris (0,1 M, pH 8,5)/ acetonitrilo (1:1).

Al graficar las intensidades en función de la concentración de sulfuro se puede apreciar la interferencia producida por GSH (figura 47 A). El ajuste a la curva de calibración a 480 nm dio un valor de intercepto mayor a cero (figura 47 B), indicando que existe emisión a dicha longitud de onda dada por el pico correspondiente a los monómeros excitados productos del GSH.

Una manera de evitar la interferencia en la emisión de excímeros por el pico de los monómeros excitados es utilizar longitudes de onda mayores para su detección. En la figura 47 se puede ver curvas de calibración realizadas a longitudes de onda mayores a 480 nm, y sus valores de intercepto y pendientes. Se aprecia una disminución en el intercepto (figura 47 B), hasta alcanzar un valor cercano a cero a 490 nm. Sin embargo, a longitudes de onda mayores a 490 nm, el intercepto de la curva de calibración sigue disminuyendo hasta valores menores que cero, alcanzando un mínimo a -2,6 URF. Este fenómeno podría deberse a la misma problemática discutida anteriormente de consumo de sulfuro por el producto de hidrólisis de MEPB, lo que implicaría una disminución en las intensidades de todos los puntos de la curva de calibración y por ende también en los valores de intercepto. Es por este fenómeno que podemos asumir que ya no existe interferencia correspondiente a monómeros excitados, cuando el valor de intercepto deja de disminuir con la longitud de onda, en este caso a 500 nm (figura 47 B). El corrimiento con respecto al máximo del pico a 480 nm implica una pérdida de sensibilidad en la detección, reflejada en una disminución en los valores de pendiente, como se aprecia en la figura 47 B. A 500 nm la disminución en el valor de la pendiente es de sólo un 14% respecto al máximo a 480 nm.

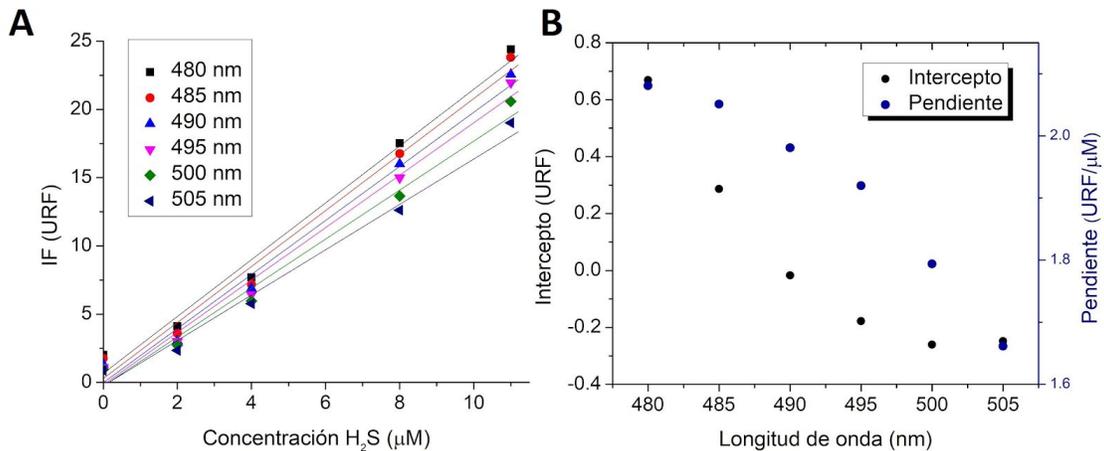


Figura 47 Curva de calibración con GSH. A) Curvas de calibración en presencia de GSH a distintas longitudes de onda. Intensidad de fluorescencia (λ_{ex} 345 nm) a distintas longitudes de onda en función de la concentración de sulfuro en reacción con MEPB (200 μM) y GSH (50 μM) por 20 min a 25 °C y luego diluida 1/40. B) Interceptos y pendientes de las mismas curvas de calibración en función de la longitud de onda.

La presencia de nucleófilos simples en altas concentraciones puede generar interferencia al reaccionar con MEPB y generar monómeros excitados cuya emisión influye a la longitud de onda de los excímeros. La presencia de estos interferentes puede ser detectada en la emisión a 380 nm, y se plantea, para minimizar dicha interferencia, la utilización de longitudes de onda mayores para medir la emisión, para evitar el aporte a la intensidad de la emisión de monómeros excitados, con la desventaja de una leve pérdida en la sensibilidad.

Aplicación biológica

Cinética de consumo de sulfuro por glóbulos rojos

De manera de aplicar el método estudiado a un sistema bioquímico, se estudió el consumo de sulfuro por glóbulos rojos utilizando dos aproximaciones: muestreo de la fase acuosa y muestreo de la fase gaseosa.

Medidas con alícuotas tomadas de la fase acuosa

Se procedió a realizar medidas de la concentración de sulfuro en fase acuosa en el tiempo luego de su exposición a una suspensión de 10% de hematocrito, según el protocolo esquematizado en la figura 48.

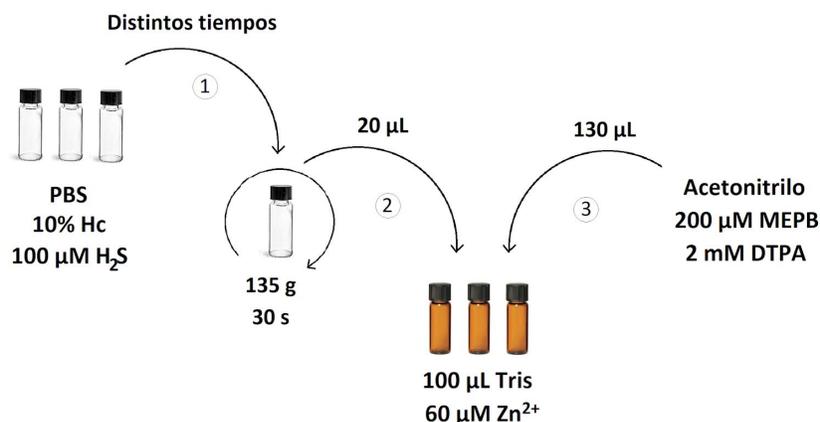


Figura 48: Esquema de las medidas de consumo de sulfuro por glóbulos rojos. Viales sellados con glóbulos rojos (10% hematocrito) y sulfuro (100 μM) en PBS fueron incubados por distintos tiempos a 25 $^{\circ}\text{C}$. Las reacciones se detuvieron con centrifugación a 135 g por 30 s, se tomaron 20 μL de sobrenadante y se inyectaron en otros viales con soluciones de Zn^{2+} en Tris (0,1 M, pH 8,5). Se incubaron las alícuotas tomadas a diferentes tiempos con MEPB (200 μM) y DTPA (2 mM) por 30 min a 25 $^{\circ}\text{C}$ en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1).

Los valores de concentración de sulfuro mostraron poca variación en el tiempo (figura 49), y la concentración no llega a 0 en el rango de tiempo estudiado. Esto es inconsistente con datos reportados previamente, donde se informó una caída del 70% del sulfuro agregado con una vida media de 14 segundos³³.

Se procede a realizar un control de reactividad del sobrenadante, en sospecha de que la metodología de detención de la reacción entre sulfuro y glóbulos mediante centrifugación estuviera fallando. Se realizan medidas de concentración por el método Zn^{2+} -DTPA inyectando 20 μL de sulfuro (100 μM) en la solución de Zn^{2+} en dos condiciones distintas, por un lado se agregan 20 μL adicionales de sobrenadante de una solución de 10% hematocrito centrifugada a 135 g por 30 s, y por otro lado, 20 μL de PBS, como se esquematiza en la figura 50.

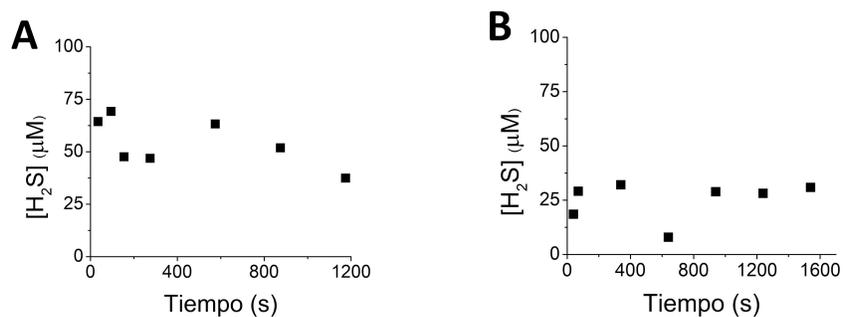


Figura 49: Cinética del consumo de sulfuro por glóbulos rojos. A y B) Dos ejemplos de medidas de concentración de sulfuro en el tiempo luego de la inyección de 100 μM a una suspensión de 10% hematocrito obtenidas mediante el método esquematizado en la figura 48. Se midió la intensidad de fluorescencia a 480 nm (λ_{ex} 345 nm) de diluciones 1/40 de dichas reacciones. Los datos de emisión se comparan con una curva de calibración realizada con la misma metodología, pero sin glóbulos.

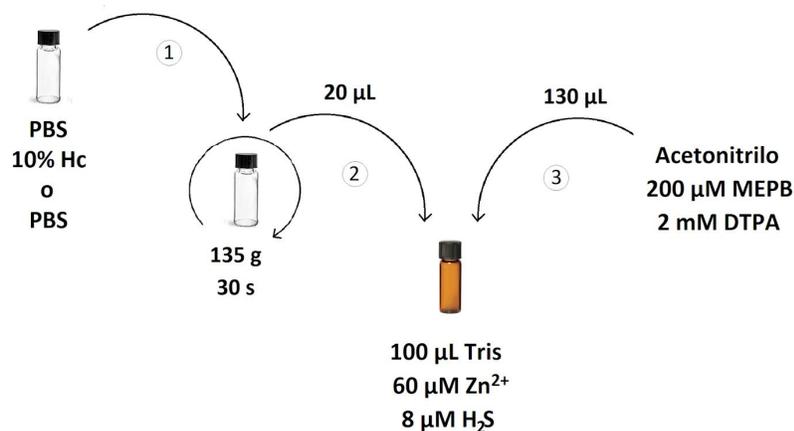


Figura 50: Esquema del control de reactividad del sobrenadante. Viales sellados con una suspensión de glóbulos rojos (10% de hematocrito) en PBS son incubados por 25 min a 25 °C. Se centrifugan a 135 g por 30 s, se toman 20 µL de sobrenadante y se inyectan en otros viales con soluciones de Zn²⁺ (60 µM) en Tris (0,1 M, pH 8,5) y sulfuro (8 µM). Luego se hacen reaccionar con MEPB (200 µM) y DTPA (2 mM) por 30 min a 25 °C en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1).

Se observa una disminución de 50% en la señal cuando el sulfuro es expuesto a 20 µL de sobrenadante de 10% hematocrito centrifugado a 135 g por 30 s (figura 51 A). Esto indica que el procedimiento de detención de la reacción entre los glóbulos rojos y el sulfuro utilizado es ineficiente. Incluso luego de la separación de las células dada por la centrifugación, algún compuesto permanece en solución que continúa consumiendo sulfuro.

La molécula reportada como responsable del consumo de sulfuro en los eritrocitos es la hemoglobina, específicamente la forma que contiene al hierro de su grupo hemo como Fe³⁺, la metahemoglobina³³. En sospecha de que sea su presencia en el sobrenadante la responsable del consumo observado, se procedió a realizar controles con distintos agentes reductores, de manera de prevenir la reacción mediante la reducción de la metahemoglobina para dar hemoglobina, la especie que contiene al hierro del grupo hemo en forma de Fe²⁺, incapaz de reaccionar con sulfuro en las condiciones del ensayo⁷⁹.

La incubación con los agentes reductores ácido ascórbico (AA) y ditionito de sodio (DT) no logró evitar el consumo de sulfuro por el sobrenadante. En la figura 51 B se aprecia que la concentración de sulfuro se mantiene dentro del rango de 50% de la inyectada en las tres condiciones en las cuales se agrega sobrenadante (SN, SN + AA y SN + DT). Estos resultados se pueden interpretar como una reducción ineficaz de la metahemoglobina presente en el sobrenadante, o como un consumo de sulfuro por otra especie distinta a la metahemoglobina.

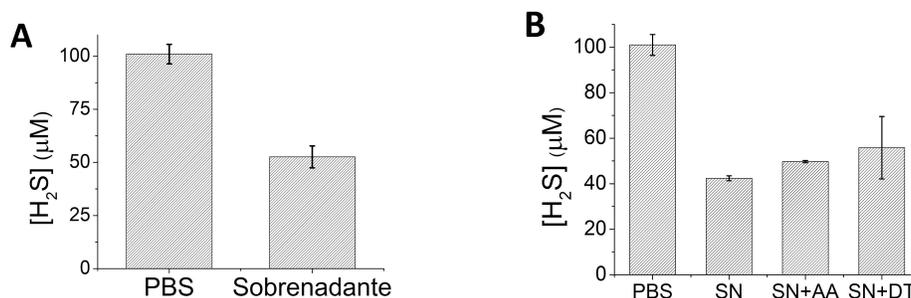


Figura 51: A) Control de reactividad del sobrenadante. Respuesta del método a la concentración de sulfuro en dos condiciones, a) control: medidas de sulfuro por el método Zn^{2+} -DTPA de una solución de sulfuro (8 μM) que se incuban con 20 μL de PBS, y b) sobrenadante: medidas de sulfuro por el método Zn^{2+} -DTPA de una solución de sulfuro (8 μM) que se incuban con 20 μL de sobrenadante de la centrifugación de la suspensión de 10% hematocrito de glóbulos rojos en PBS a 135 g por 30 s. **B) Prueba de reductores para eliminar la interferencia del sobrenadante.** Medidas de concentración de sulfuro por el método Zn^{2+} -DTPA de una solución 8 μM (control) con el agregado de 20 μL de sobrenadante de una suspensión de glóbulos rojos (10% de hematocrito) centrifugada a 135 g por 30 s (SN) o con el agregado adicional de ácido ascórbico (1 mM) (SN + AA) o ditionito de sodio (1 mM) (SN + DT).

No se logró desarrollar una metodología para la medida de consumo de sulfuro por glóbulos rojos en solución, ya que no se encontró una forma de detención de la reacción y separación de las células efectiva. Se especula sobre la presencia de algún compuesto consumidor de sulfuro externo a los eritrocitos que interfiere con la medida.

Dada la imposibilidad de medir el consumo de sulfuro por glóbulos rojos en la fase acuosa, y como se ya comprobó la factibilidad de detección cuantitativa de sulfuro en solución a partir de alícuotas de la fase gaseosa, se opta por aplicar dicha metodología para estudiar el consumo.

Medidas con alícuotas tomadas de la fase gaseosa

Cinética de equilibramiento de fases

El sulfuro en el sistema utilizado se encuentra involucrado en tres procesos, por un lado el equilibramiento entre las fases acuosa y gaseosa, en segundo lugar en la difusión a través de la membrana celular de los eritrocitos y en tercer lugar en una presunta reacción con la metahemoglobina para dar la especie $MetHb\ Fe(III)-SH^-$ dentro del eritrocito⁸⁴. Por lo que, para poder asociar las medidas de sulfuro en el tiempo a su reacción con metahemoglobina, los otros dos procesos no deben limitar la cinética. La difusión a través de membranas biológicas fue estudiada y su alto coeficiente de permeabilidad implica que dicho proceso no sea limitante¹⁷. Para poder despreciar el proceso de equilibramiento de fases, y validar el estudio del consumo de sulfuro por glóbulos rojos en el sistema, se estudia su cinética de intercambio. Se mide el aumento en la concentración de H_2S en la fase gaseosa en el tiempo luego de la inyección de una cantidad conocida en la fase acuosa del sistema.

Considerando que inicialmente todo el sulfuro se encuentra en la fase acuosa, se puede racionalizar al equilibramiento de fases como una reacción irreversible en la que el H_2S en la fase acuosa pasa a la fase gaseosa según:



con su correspondiente constante cinética k . Si bien la velocidad del intercambio depende del área de la interfase líquido/gas, mantendremos la relación de volúmenes constante así como las condiciones de agitación. De esta forma, podemos plantear la variación de $[H_2S]_g$ en el tiempo como si fuera el producto de una reacción de primer orden irreversible

$$[H_2S]_g(t) = [H_2S]_{g,eq} - [H_2S]_{g,eq} \cdot e^{-k t} \quad \text{(Ec. 60)}$$

y podemos ajustar los valores experimentales de $[H_2S]_g$ en función del tiempo a una ecuación exponencial. En la figura 52 A, se observa cómo aumenta $[H_2S]_g$ en el tiempo luego de la inyección de 20×10^{-8} moles de sulfuro en la fase acuosa. El ajuste a una ecuación exponencial dio un valor de amplitud de $8,1 \pm 0,6 \mu\text{M}$. Este parámetro se corresponde con la concentración de H_2S en la fase gaseosa una vez alcanzado el equilibrio, y es muy cercano al valor de concentración de H_2S esperado en la fase gaseosa de acuerdo al equilibrio ($9,4 \mu\text{M}$) obtenido a partir de la Ec. 31. El valor experimental se aparta del teórico un 14%, que puede considerarse como dentro del error experimental dada la dificultad que implica tomar muestras de gas y lo sensible de los equilibrios a cambios de temperatura y presión. También podría influir en alguna medida una pérdida de sulfuro en el sistema, que redundaría en una $[H_2S]_g$ en el equilibrio menor a la calculada. La constante observada obtenida del ajuste fue de $(9 \pm 2) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Este valor corresponde a la constante cinética del proceso de equilibramiento en las condiciones del ensayo, que refleja a una vida media de 1,3 min. A partir de este valor de vida media podemos considerar que el intercambio planteado toma unos 13 min, que en nuestro caso se corresponde al tiempo en el cual las concentraciones de H_2S en la fase acuosa y en la fase gaseosa alcanzan el equilibrio.

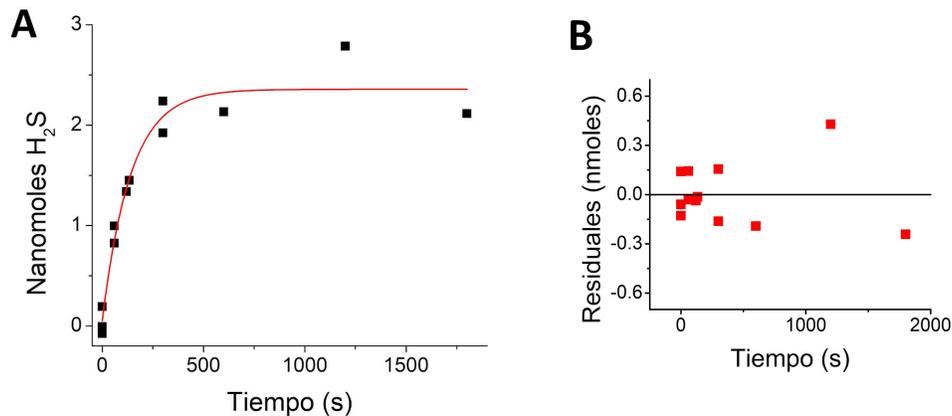


Figura 52: Cinética de equilibrio de fases. A) Moles de sulfuro extraídos de la fase gaseosa del sistema en función del tiempo luego de la inyección de 20×10^{-8} moles en solución. Se tomaron 200 μL de fase gaseosa a distintos tiempos, que se burbujearon en una solución de acetato de Zn^{2+} ($X \mu\text{M}$) en Tris (0,1 M, pH 8,5). Se inició la reacción de detección con el agregado de MEPB (200 μM) y DTPA (2 mM), dejando reaccionar por 30 min en Tris (0,1 M, pH 8,5)/acetonitrilo (1:1). Luego se midió la emisión a 480 nm de diluciones 1/40 de dichas soluciones. B) Residuales de dicho ajuste en función del tiempo.

Los valores reportados para el consumo de sulfuro por glóbulos rojos son de $k_{\text{OBS}} = 5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ para una solución de 10 % de hematocrito en un sistema idéntico al utilizado en este trabajo³³.

Esta constante se encuentra dentro del mismo orden que la constante cinética de equilibramiento de fases determinada, lo que implica que la constante reportada no se corresponda al consumo de sulfuro por glóbulos rojos. Existen dos posibles escenarios: 1- Puede ser que el proceso de consumo de sulfuro por glóbulos rojos sea mucho más rápido que el equilibramiento de fases. En ese caso la constante reportada por Vitvitsky et al. se correspondería al proceso de equilibramiento de fases estudiada en este trabajo, y esto es coherente con el hecho de que ambos valores se encuentren dentro del mismo orden. 2- La otra opción es que el consumo de sulfuro por glóbulos rojos ocurra con una constante cinética similar a la de equilibramiento de fases, lo que significaría que la constante reportada se corresponda a una combinación de ambos procesos, el equilibramiento de sulfuro en las fases acuosa y gaseosa y su consumo por glóbulos rojos.

Cualquiera sea el caso, no se considera conveniente el estudio de consumo de sulfuro por glóbulos rojos a través de esta metodología. Se podría, por ejemplo, utilizar una concentración de hematocrito mucho menor, de manera de enlentecer el proceso y que el equilibramiento de fases se vuelva despreciable, pero al no tener mejores estimados de la constante cinética para dicho proceso no podemos saber cuánto es necesario disminuir la concentración de eritrocitos.

6. Conclusiones

En este trabajo se logró desarrollar un método novedoso para la detección cuantitativa de sulfuro de hidrógeno.

A través de caracterizaciones espectroscópicas y separativas se logró confirmar la formación de excímeros de pireno a partir de la doble reacción de sulfuro de hidrógeno con una sonda de pireno derivatizada con N-etilmaleimida, y se observó una selectividad en la formación de excímeros por parte del sulfuro frente a los tioles.

Se optimizaron las condiciones de reacción para el método, al estudiar la hidrólisis de la sonda y la solubilidad de los productos de reacción se determinaron las condiciones de solvente a utilizar. A través de estudios cinéticos y con el apoyo de modelos matemáticos se realizó la caracterización cinética de la doble reacción de sulfuro con la sonda MEPB, pudiendo definir el tiempo de incubación del método.

Se comprobó la linealidad de la respuesta fluorescente con la concentración de sulfuro en el método en distintas condiciones, comprobando la factibilidad del uso de la formación de excímeros pireno para la detección cuantitativa de sulfuro. También se comprobó la posibilidad de acoplamiento del método con el atrapado de sulfuro en partículas de ZnS y se desarrolló una nueva metodología para la liberación del sulfuro de dichas partículas a través del agregado de DTPA. También se estudió la interferencia por parte de los tioles, observando que ocurre pero es leve, y se da particularmente a altas concentraciones.

Se aplicó el método para la determinación de la constante cinética de equilibrio de fases del sulfuro entre fase acuosa y gaseosa de un sistema cerrado comúnmente utilizado para el estudio de sulfuro, que faltaba en la literatura. Lo que llevó al cuestionamiento de estudios cinéticos realizados a partir de dicho sistema, poniendo en duda la constante cinética de consumo de sulfuro por glóbulos rojos reportada.

La sonda utilizada tiene sus desventajas, la presencia de un enlace éster entre el grupo pirenilo y el grupo maleimida implica que la misma puede sufrir una reacción de hidrólisis o fotólisis, generando distintas problemáticas en el método. Se podría mejorar la sensibilidad y la robustez del método a partir de la utilización de una sonda en la cual el enlace éster sea reemplazado, por un grupo más estable, por ejemplo una amida.

La baja solubilidad de los productos de reacción implica que se necesite un solvente altamente apolar para permitir la reacción y formación de excímeros, por lo que el método se limita a medidas *in vitro*.

A través de este trabajo se pretende abrir camino para el desarrollo de nuevos métodos de detección de sulfuro basados en la formación de excímeros de pireno optimizados, por ejemplo con mejor solubilidad y una estabilidad mayor en la sonda.

7. Bibliografía

1. Cotton, F. A., Wilkinson, G., Murillo, C. A., Bochmann, M. & Grimes, R. *Advanced inorganic chemistry*. vol. 5 (Wiley New York, 1988).
2. Millero, F. J. The thermodynamics and kinetics of the hydrogen sulfide system in natural waters. *Mar. Chem.* **18**, 121–147 (1986).
3. Koppenol, W. H. & Bounds, P. L. Signaling by sulfur-containing molecules. Quantitative aspects. *Arch. Biochem. Biophys.* **617**, 3–8 (2017).
4. Das, T. N., Huie, R. E., Neta, P. & Padmaja, S. Reduction Potential of the Sulfhydryl Radical: Pulse Radiolysis and Laser Flash Photolysis Studies of the Formation and Reactions of $\cdot\text{SH}$ and $\text{HSSH}\cdot^-$ in Aqueous Solutions. *J. Phys. Chem. A* **103**, 5221–5226 (1999).
5. Zhu, J., Petit, K., Colson, A. O., DeBolt, S. & Sevilla, M. D. Reactions of $\text{HS}^{\text{sm-bullet}}$ and $\text{S}^{\text{sm-bullet}}$ with molecular oxygen, H_2S , HS^- , and S^{2-} : Formation of $\text{SO}_2^{\text{sm-bullet}}$, $\text{HSSH}^{\text{sm-bullet}}$, $\text{HSS}^{\text{sm-bullet}2-}$, and $\text{HSS}^{\text{sm-bullet}}$. *J. Phys. Chem.* **95**, 3676–3681 (1991).
6. O'Brien, D. J. & Birkner, F. B. Kinetics of oxygenation of reduced sulfur species in aqueous solution. *Environ. Sci. Technol.* **11**, 1114–1120 (1977).
7. Sun, J. & Stanbury, D. M. Trace metal-ion catalysis of oxidation of aqueous hydrogen sulfide by outer-sphere oxidants. *Inorganica Chim. Acta* **336**, 39–45 (2002).
8. Mustafa, A. K. *et al.* H₂S Signals Through Protein S-Sulfhydration. *Sci. Signal.* **2**, ra72–ra72 (2009).
9. Kabil, O. & Banerjee, R. Redox Biochemistry of Hydrogen Sulfide. *J. Biol. Chem.* **285**, 21903–21907 (2010).
10. Cuevasanta, E. *et al.* Kinetics of formation and reactivity of the persulfide in the one-cysteine peroxiredoxin from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **294**, 13593–13605 (2019).
11. Cuevasanta, E. *et al.* Reaction of Hydrogen Sulfide with Disulfide and Sulfenic Acid to Form the Strongly Nucleophilic Persulfide. *J. Biol. Chem.* **290**, 26866–26880 (2015).

12. Carballal, S. *et al.* Reactivity of hydrogen sulfide with peroxynitrite and other oxidants of biological interest. *Free Radic. Biol. Med.* **50**, 196–205 (2011).
13. Benchoam, D., Cuevasanta, E., Möller, M. N. & Alvarez, B. Hydrogen Sulfide and Persulfides Oxidation by Biologically Relevant Oxidizing Species. *Antioxidants* **8**, 48 (2019).
14. Cuevasanta, E., Möller, M. N. & Alvarez, B. Biological chemistry of hydrogen sulfide and persulfides. *Arch. Biochem. Biophys.* **617**, 9–25 (2017).
15. Nicholls, P. Inhibition of Cytochrome c Oxidase by Sulphide. *Biochem. Soc. Trans.* **3**, 316–319 (1975).
16. Goubern, M., Andriamihaja, M., Nübel, T., Blachier, F. & Bouillaud, F. Sulfide, the first inorganic substrate for human cells. *FASEB J.* **21**, 1699–1706 (2007).
17. Cuevasanta, E., Denicola, A., Alvarez, B. & Möller, M. N. Solubility and Permeation of Hydrogen Sulfide in Lipid Membranes. *PLoS ONE* **7**, e34562 (2012).
18. Mathai, J. C. *et al.* No facilitator required for membrane transport of hydrogen sulfide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 16633–16638 (2009).
19. Abe, K. & Kimura, H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J. Neurosci.* **16**, 1066–1071 (1996).
20. Hosoki, R., Matsuki, N. & Kimura, H. The Possible Role of Hydrogen Sulfide as an Endogenous Smooth Muscle Relaxant in Synergy with Nitric Oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**, 527–531 (1997).
21. Zhao, W. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *EMBO J.* **20**, 6008–6016 (2001).
22. Kimura, Y. & Kimura, H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB J.* **18**, 1165–1167 (2004).
23. Nicholson, C. K. & Calvert, J. W. Hydrogen sulfide and ischemia–reperfusion injury. *Pharmacol. Res.* **62**, 289–297 (2010).

24. Li, L. *et al.* Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *FASEB J.* **19**, 1196–1198 (2005).
25. Zanardo, R. C. O. *et al.* Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *FASEB J.* **20**, 2118–2120 (2006).
26. Sen, N. *et al.* Hydrogen Sulfide-Linked Sulfhydration of NF- κ B Mediates Its Antiapoptotic Actions. *Mol. Cell* **45**, 13–24 (2012).
27. Sivarajah, A. *et al.* ANTI-APOPTOTIC AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF HYDROGEN SULFIDE IN A RAT MODEL OF REGIONAL MYOCARDIAL I/R: *Shock* **31**, 267–274 (2009).
28. Yang, G., Wu, L. & Wang, R. Pro-apoptotic effect of endogenous H₂S on human aorta smooth muscle cells. *FASEB J.* **20**, 553–555 (2006).
29. Peng, Y.-J. *et al.* H₂S mediates O₂ sensing in the carotid body. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 10719–10724 (2010).
30. Blackstone, E., Morrison, M. & Roth, M. B. H₂S Induces a Suspended Animation-Like State in Mice. *Science* **308**, 518–518 (2005).
31. Hildebrandt, T. M. & Grieshaber, M. K. Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria: Reactions of mitochondrial sulfide oxidation. *FEBS J.* **275**, 3352–3361 (2008).
32. Vitvitsky, V. *et al.* Cytochrome c Reduction by H₂ S Potentiates Sulfide Signaling. *ACS Chem. Biol.* **13**, 2300–2307 (2018).
33. Vitvitsky, V., Yadav, P. K., Kurthen, A. & Banerjee, R. Sulfide oxidation by a noncanonical pathway in red blood cells generates thiosulfate and polysulfides. *J. Biol. Chem.* **290**, 8310–8320 (2015).
34. Stipanuk, M. H. SULFUR AMINO ACID METABOLISM: Pathways for Production and Removal of Homocysteine and Cysteine. *Annu. Rev. Nutr.* **24**, 539–577 (2004).
35. Singh, S., Padovani, D., Leslie, R. A., Chiku, T. & Banerjee, R. Relative Contributions of

- Cystathionine β -Synthase and γ -Cystathionase to H₂S Biogenesis via Alternative Trans-sulfuration Reactions. *J. Biol. Chem.* **284**, 22457–22466 (2009).
36. Taoka, S. & Banerjee, R. Characterization of NO binding to human cystathionine β -synthase:: Possible implications of the effects of CO and NO binding to the human enzyme. *J. Inorg. Biochem.* **87**, 245–251 (2001).
37. Carballal, S. *et al.* Kinetics of Nitrite Reduction and Peroxynitrite Formation by Ferrous Heme in Human Cystathionine β -Synthase. *J. Biol. Chem.* **291**, 8004–8013 (2016).
38. Finkelstein, J. D., Kyle, W. E., Martin, J. J. & Pick, A.-M. Activation of cystathionine synthase by adenosylmethionine and adenosylethionine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **66**, 81–87 (1975).
39. Koutmos, M., Kabil, O., Smith, J. L. & Banerjee, R. Structural basis for substrate activation and regulation by cystathionine beta-synthase (CBS) domains in cystathionine β -synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 20958–20963 (2010).
40. Bao, L., Vlček, Č., Pačes, V. & Kraus, J. P. Identification and Tissue Distribution of Human Cystathionine β -Synthase mRNA Isoforms. *Arch. Biochem. Biophys.* **350**, 95–103 (1998).
41. Chiku, T. *et al.* H₂S Biogenesis by Human Cystathionine γ -Lyase Leads to the Novel Sulfur Metabolites Lanthionine and Homolanthionine and Is Responsive to the Grade of Hyperhomocysteinemia. *J. Biol. Chem.* **284**, 11601–11612 (2009).
42. Filipovic, M. R., Zivanovic, J., Alvarez, B. & Banerjee, R. Chemical Biology of H₂S Signaling through Persulfidation. *Chem. Rev.* **118**, 1253–1337 (2018).
43. Sun, Q. *et al.* Structural Basis for the Inhibition Mechanism of Human Cystathionine γ -Lyase, an Enzyme Responsible for the Production of H₂S. *J. Biol. Chem.* **284**, 3076–3085 (2009).
44. Kamoun, P. Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals. *Amino Acids* **26**, 243–254 (2004).
45. 裕樹小笠原, 伸二磯田 & 信三田辺. Tissue and Subcellular Distribution of Bound and

- Acid-Labile Sulfur, and the Enzymic Capacity for Sulfide Production in the Rat. *Biol. Pharm. Bull.* **17**, 1535–1542 (1994).
46. Yuan, G. *et al.* Protein kinase G–regulated production of H₂S governs oxygen sensing. *Sci. Signal.* **8**, ra37–ra37 (2015).
47. Shibuya, N. *et al.* 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase Produces Hydrogen Sulfide and Bound Sulfane Sulfur in the Brain. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 703–714 (2009).
48. Yadav, P. K., Yamada, K., Chiku, T., Koutmos, M. & Banerjee, R. Structure and Kinetic Analysis of H₂S Production by Human Mercaptopyruvate Sulfurtransferase. *J. Biol. Chem.* **288**, 20002–20013 (2013).
49. T, U., S, U., S, Y., M, K. & K, W. Purification and characterization of mitochondrial cysteine aminotransferase from rat liver. *Physiol. Chem. Phys.* **10**, 483–500 (1978).
50. Nagahara, N., Ito, T., Kitamura, H. & Nishino, T. Tissue and subcellular distribution of mercaptopyruvate sulfurtransferase in the rat: confocal laser fluorescence and immunoelectron microscopic studies combined with biochemical analysis. *Histochem. Cell Biol.* **110**, 243–250 (1998).
51. Fräsdorf, B., Radon, C. & Leimkühler, S. Characterization and Interaction Studies of Two Isoforms of the Dual Localized 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase TUM1 from Humans. *J. Biol. Chem.* **289**, 34543–34556 (2014).
52. Yadav, P. K., Vitvitsky, V., Carballal, S., Seravalli, J. & Banerjee, R. Thioredoxin regulates human mercaptopyruvate sulfurtransferase at physiologically-relevant concentrations. *J. Biol. Chem.* **295**, 6299–6311 (2020).
53. Bouillaud, F. & Blachier, F. Mitochondria and Sulfide: A Very Old Story of Poisoning, Feeding, and Signaling? *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 379–391 (2011).
54. Stevens, C. E. & Hume, I. D. Contributions of Microbes in Vertebrate Gastrointestinal Tract to Production and Conservation of Nutrients. *Physiol. Rev.* **78**, 393–427 (1998).

55. Littman, D. R. & Pamer, E. G. Role of the Commensal Microbiota in Normal and Pathogenic Host Immune Responses. *Cell Host Microbe* **10**, 311–323 (2011).
56. Singh, S. B. & Lin, H. C. Hydrogen Sulfide in Physiology and Diseases of the Digestive Tract. *Microorganisms* **3**, 866–889 (2015).
57. Florin, T., Neale, G., Gibson, G. R., Christl, S. U. & Cummings, J. H. Metabolism of dietary sulphate: absorption and excretion in humans. *Gut* **32**, 766–773 (1991).
58. Gibson, G. R., Cummings, J. H. & Macfarlane, G. T. Competition for hydrogen between sulphate-reducing bacteria and methanogenic bacteria from the human large intestine. *J. Appl. Bacteriol.* **65**, 241–247 (1988).
59. Suarez, F., Furne, J., Springfield, J. & Levitt, M. Production and elimination of sulfur-containing gases in the rat colon. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **274**, G727–G733 (1998).
60. Furne, J., Springfield, J., Koenig, T., DeMaster, E. & Levitt, M. D. Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: a specialized function of the colonic mucosa. *Biochem. Pharmacol.* **62**, 255–259 (2001).
61. Levitt, M. D., Furne, J., Springfield, J., Suarez, F. & DeMaster, E. Detoxification of hydrogen sulfide and methanethiol in the cecal mucosa. *J. Clin. Invest.* **104**, 1107–1114 (1999).
62. Lagoutte, E. *et al.* Oxidation of hydrogen sulfide remains a priority in mammalian cells and causes reverse electron transfer in colonocytes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1797**, 1500–1511 (2010).
63. Landry, A. P. *et al.* A Catalytic Trisulfide in Human Sulfide Quinone Oxidoreductase Catalyzes Coenzyme A Persulfide Synthesis and Inhibits Butyrate Oxidation. *Cell Chem. Biol.* **26**, 1515-1525.e4 (2019).
64. Flannigan, K. L., McCoy, K. D. & Wallace, J. L. Eukaryotic and prokaryotic contributions to colonic hydrogen sulfide synthesis. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **301**, G188–G193 (2011).

65. Furne, J., Saeed, A. & Levitt, M. D. Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **295**, R1479–R1485 (2008).
66. Cooper, C. E. & Brown, G. C. The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. *J. Bioenerg. Biomembr.* **40**, 533 (2008).
67. Bostelaar, T. *et al.* Hydrogen Sulfide Oxidation by Myoglobin. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 8476–8488 (2016).
68. Brito, J. A. *et al.* Structural and Functional Insights into Sulfide:Quinone Oxidoreductase. *Biochemistry* **48**, 5613–5622 (2009).
69. Libiad, M., Yadav, P. K., Vitvitsky, V., Martinov, M. & Banerjee, R. Organization of the Human Mitochondrial Hydrogen Sulfide Oxidation Pathway. *J. Biol. Chem.* **289**, 30901–30910 (2014).
70. Augustyn, K. D. C., Jackson, M. R. & Jorns, M. S. Use of Tissue Metabolite Analysis and Enzyme Kinetics To Discriminate between Alternate Pathways for Hydrogen Sulfide Metabolism. *Biochemistry* **56**, 986–996 (2017).
71. Tiranti, V. *et al.* Loss of ETHE1, a mitochondrial dioxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy. *Nat. Med.* **15**, 200–205 (2009).
72. Kabil, O. & Banerjee, R. Characterization of Patient Mutations in Human Persulfide Dioxygenase (ETHE1) Involved in H₂S Catabolism. *J. Biol. Chem.* **287**, 44561–44567 (2012).
73. Tiranti, V. *et al.* Ethylmalonic Encephalopathy Is Caused by Mutations in ETHE1, a Gene Encoding a Mitochondrial Matrix Protein. *Am. J. Hum. Genet.* **74**, 239–252 (2004).
74. Olson, K. R. & Whitfield, N. L. Hydrogen Sulfide and Oxygen Sensing in the Cardiovascular System. *Antioxid. Redox Signal.* **12**, 1219–1234 (2009).
75. Meister, A. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology.* (John Wiley & Sons, 2009).

76. Libiad, M., Sriraman, A. & Banerjee, R. Polymorphic Variants of Human Rhodanese Exhibit Differences in Thermal Stability and Sulfur Transfer Kinetics. *J. Biol. Chem.* **290**, 23579–23588 (2015).
77. Feng, C., Tollin, G. & Enemark, J. H. Sulfite oxidizing enzymes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1774**, 527–539 (2007).
78. Enemark, J. H., Astashkin, A. V. & Raitsimring, A. M. Variable Frequency Pulsed EPR Studies of Molybdenum Enzymes: Structure of Molybdenum Enzymes. in *Paramagnetic Resonance of Metallobiomolecules* vol. 858 179–192 (American Chemical Society, 2003).
79. Nichol, A. W., Hendry, I., Morell, D. B. & Clezy, P. S. Mechanism of formation of sulphhaemoglobin. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **156**, 97–108 (1968).
80. Berzofsky, J. A., Peisach, J. & Blumberg, W. E. Sulfheme Proteins II. THE REVERSIBLE OXYGENATION OF FERROUS SULFMYOGLOBIN. *J. Biol. Chem.* **246**, 7366–7372 (1971).
81. Ríos-González, B. B., Román-Morales, E. M., Pietri, R. & López-Garriga, J. Hydrogen sulfide activation in hemeproteins: The sulfheme scenario. *J. Inorg. Biochem.* **133**, 78–86 (2014).
82. Flexman, A. M., Vicario, G. D. & Schwarz, S. K. Dark green blood in the operating theatre. *The Lancet* **369**, 1972 (2007).
83. On the combinations of methæmoglobin with H_2S . *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Contain. Pap. Biol. Character* **113**, 393–404 (1933).
84. Vitvitsky, V. et al. Structural and Mechanistic Insights into Hemoglobin-catalyzed Hydrogen Sulfide Oxidation and the Fate of Polysulfide Products. *J. Biol. Chem.* **292**, 5584–5592 (2017).
85. Smith, R. P. & Gosselin, R. E. On the mechanism of sulfide inactivation by methemoglobin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **8**, 159–172 (1966).
86. Pietri, R., Román-Morales, E. & López-Garriga, J. Hydrogen Sulfide and Hemeproteins: Knowledge and Mysteries. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 393–404 (2011).
87. Mitra, K., Singha, A. & Dey, A. Mechanism of Reduction of Ferric Porphyrins by Sulfide:

- Identification of a Low Spin Fe^{III}–SH Intermediate. *Inorg. Chem.* **56**, 3916–3925 (2017).
88. Ruetz, M. *et al.* A distal ligand mutes the interaction of hydrogen sulfide with human neuroglobin. *J. Biol. Chem.* **292**, 6512–6528 (2017).
89. Nicholls, P. & Kim, J.-K. Sulphide as an inhibitor and electron donor for the cytochrome c oxidase system. *Can. J. Biochem.* **60**, 613–623 (1982).
90. Olson, K. R. Is hydrogen sulfide a circulating “gasotransmitter” in vertebrate blood? *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1787**, 856–863 (2009).
91. Ubuka, T. Assay methods and biological roles of labile sulfur in animal tissues. *J. Chromatogr. B* **781**, 227–249 (2002).
92. Whitfield, N. L., Kreimier, E. L., Verdial, F. C., Skovgaard, N. & Olson, K. R. Reappraisal of H₂S/sulfide concentration in vertebrate blood and its potential significance in ischemic preconditioning and vascular signaling. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **294**, R1930–R1937 (2008).
93. Vitvitsky, V., Kabil, O. & Banerjee, R. High Turnover Rates for Hydrogen Sulfide Allow for Rapid Regulation of Its Tissue Concentrations. *Antioxid. Redox Signal.* **17**, 22–31 (2012).
94. Zuman, P. & Szafranski, W. Ultraviolet spectra of hydroxide, alkoxide, and hydrogen sulfide anions. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac50008a027> (2002) doi:10.1021/ac50008a027.
95. Pluth, M. D., Bailey, T. S., Hammers, M. D. & Montoya, L. A. Chemical Tools for Studying Biological Hydrogen Sulfide. in *Biochalcogen Chemistry: The Biological Chemistry of Sulfur, Selenium, and Tellurium* vol. 1152 15–32 (American Chemical Society, 2013).
96. Lin, V. S., Lippert, A. R. & Chang, C. J. Cell-trappable fluorescent probes for endogenous hydrogen sulfide signaling and imaging H₂O₂-dependent H₂S production. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 7131–7135 (2013).
97. Lippert, A. R., New, E. J. & Chang, C. J. Reaction-Based Fluorescent Probes for Selective Imaging of Hydrogen Sulfide in Living Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 10078–10080 (2011).

98. Doeller, J. E. *et al.* Polarographic measurement of hydrogen sulfide production and consumption by mammalian tissues. *Anal. Biochem.* **341**, 40–51 (2005).
99. Sasakura, K. *et al.* Development of a Highly Selective Fluorescence Probe for Hydrogen Sulfide. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 18003–18005 (2011).
100. Hou, F. *et al.* A Retrievable and Highly Selective Fluorescent Probe for Monitoring Sulfide and Imaging in Living Cells. *Inorg. Chem.* **51**, 2454–2460 (2012).
101. Kar, C., Adhikari, M. D., Ramesh, A. & Das, G. NIR- and FRET-Based Sensing of Cu²⁺ and S²⁻ in Physiological Conditions and in Live Cells. *Inorg. Chem.* **52**, 743–752 (2013).
102. Chen, Y. *et al.* A Ratiometric Fluorescent Probe for Rapid Detection of Hydrogen Sulfide in Mitochondria. *Angew. Chem.* **125**, 1732–1735 (2013).
103. Lin, V. S., Chen, W., Xian, M. & Chang, C. J. Chemical probes for molecular imaging and detection of hydrogen sulfide and reactive sulfur species in biological systems. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 4596–4618 (2015).
104. Qian, Y. *et al.* Selective fluorescent probes for live-cell monitoring of sulphide. *Nat. Commun.* **2**, 495 (2011).
105. Liu, C. *et al.* Reaction Based Fluorescent Probes for Hydrogen Sulfide. *Org. Lett.* **14**, 2184–2187 (2012).
106. Shen, X. *et al.* Measurement of plasma hydrogen sulfide in vivo and in vitro. *Free Radic. Biol. Med.* **50**, 1021–1031 (2011).
107. Fogo, J. K. & Popowsky, M. Spectrophotometric Determination of Hydrogen Sulfide. *Anal. Chem.* **21**, 732–734 (1949).
108. Jameson, D. M. Introduction to Fluorescence. 308.
109. Sassaroli, M., Vauhkonen, M., Perry, D. & Eisinger, J. Lateral diffusivity of lipid analogue excimeric probes in dimyristoylphosphatidylcholine bilayers. *Biophys. J.* **57**, 281–290 (1990).
110. Betcher-Lange, S. L. & Lehrer, S. S. Pyrene excimer fluorescence in rabbit skeletal

- alphaalphanatropomyosin labeled with N-(1-pyrene)maleimide. A probe of sulfhydryl proximity and local chain separation. *J. Biol. Chem.* **253**, 3757–3760 (1978).
111. Somerharju, P. Pyrene-labeled lipids as tools in membrane biophysics and cell biology. *Chem. Phys. Lipids* **116**, 57–74 (2002).
112. De Bruyn, W. J. *et al.* Henry's law solubilities and Setchenow coefficients for biogenic reduced sulfur species obtained from gas-liquid uptake measurements. *J. Geophys. Res.* **100**, 7245–7251 (1995).
113. Loy, H. L. & Himmelblau, D. M. THE FIRST IONIZATION CONSTANT OF HYDROGEN SULFIDE IN WATER. *J. Phys. Chem.* **65**, 264–267 (1961).
114. Kuzmic, P. (1996) *Anal. Biochem.* **237**, 260-273. 'Program DYNAFIT for the Analysis of Enzyme Kinetic Data: Application to HIV Proteinase'.
115. Espenson, J. H. *Chemical Kinetics and Reaction Mechanisms*. (McGraw-Hill, 1995).
116. Williams, R., Yocom, P. N. & Stofko, F. S. Preparation and properties of spherical zinc sulfide particles. *J. Colloid Interface Sci.* **106**, 388–398 (1985).
117. Hart, J. R. Ethylenediaminetetraacetic Acid and Related Chelating Agents. in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (American Cancer Society, 2000).
doi:10.1002/14356007.a10_095.